Untersuchungen zur Genese und Strukturaufklärung von Huminsäuren

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
WOLFRAM EISENER
aus Ebingen

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0007

Untersuchungen zur Genese und Strukturaufklärung von Huminsäuren

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
WOLFRAM EISENER
aus Ebingen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juli 1983

Dekan: Prof. Dr. J. Strähle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bayer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Voelter

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer betrieb · Tübingen

Abstract

EISENER, WOLFRAM

UNTERSUCHUNGEN ZUR GENESE UND STRUKTURAUFKLÄRUNG VON HUMINSÄUREN

In einem speziell konstruierten Laborreaktor wurden Klär- und Bakterienschlämme aerob-thermophil abgebaut. Die Bakterienschlämme wurden in einer Versuchsanlage bei einer Ernährung mit Zucker bzw. Milch gezüchtet. Durch fortlaufende Temperaturmessung im Laborreaktor konnten die Reaktionswärmen bestimmt werden. Aus den abgebauten Schlämmen wurden die gebildeten Huminsäuren quantitativ isoliert. Die Huminsäureausbeute war direkt proportional der Wärmemenge pro Gramm abgebauter organischer Trockensubstanz und stieg exponentiell mit der Zunahme der Gesamtreaktionswärme. In diese Gesetzmäßigkeit ließen sich die Ergebnisse aller Abbauversuche mit einer sehr hohen Korrelation einordnen. Daraus wurde gefolgert, daß thermophile Mikroorganismen an der Bildung der Huminsäuren beteiligt sein müssen.

Durch ^{1}H-NMR-Messungen an einem 400 MHz-Gerät und ^{13}C-NMR-Festkörper-Messungen nach der CP-MAS-Technik konnten bei der Strukturuntersuchung der Huminsäuren Etherfunktionen, Ketal- und Acetalbindungen, kurzkettige und vielfach verzweigte aliphatische Anteile, periphere Carboxylgruppen sowie kurzkettige terminale Alkylreste nachgewiesen werden, jedoch keine aromatischen oder heterocyclischen Gruppierungen. Strukturelemente, die einfach gebundenen Sauerstoff enthalten, stellten sich als das entscheidende Bindungsprinzip in den nativen Huminsäuren dar. Das aus Integrationsdaten ermittelte C/O-Verhältnis zeigte eine gute Übereinstimmung mit der Elementaranalyse. Etherspaltung mit HI scheiterte an dem Ausfallen der Huminsäuren aus der Reaktionsmischung, außerdem wurden die I^--Ionen zu freiem I_2 oxidiert. Es wurden aber Ketalgruppen gespalten und einige Carboxylgruppen verestert, andere Carboxylgruppen entweder reduziert oder decarboxiliert.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1979 bis Dezember 1982 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Bayer im Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. E. Bayer, danke ich für die großzügige Unterstützung der Arbeit, und das rege Interesse, das er ihr stets entgegengebracht hat.

Für Ursula

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.	Überblick	1
1.1.	Vorkommen	2
1.2.	Entstehung	2
1.3.	Eigenschaften	3
1.4.	Strukturaufklärung	4
2.	Problemstellung	7
II.	ALLGEMEINER TEIL	8
1.	Bildung von Huminsäuren	8
2.	Gewinnung von Bakterienschlämmen	9
2.1.	Aufbau der Versuchsanlage	9
2.2.	Funktionsweise	9
2.3.	Betrieb der Versuchsanlage mit Zucker als Substrat	11
2.4.	Betrieb der Versuchsanlage mit Milch als Substrat	12
3.	Aerob-thermophiler Abbau von eingedickten Klär- und Bakterienschlämmen	13
3.1.	Aufbau des Laborreaktors	13
3.2.	Funktionsweise des Laborreaktors	15
3.3.	Sauerstoffbedarf	16
3.4.	Energiebilanz	17
4.	Versuchsdurchführung	20
4.1.	Versuche mit Klärschlamm kommunaler Kläranlagen	21
4.1.1.	Temperaturverlauf	23

4.1.2.	Bakterienschlamm	24
4.1.3.	Huminsäure	26
4.1.4.	Reaktionswärmen	27
4.1.5.	Bewertung	28
4.2.	Versuche mit zuckerernährtem Bakterienschlamm aus der Versuchsanlage	29
4.2.1.	Temperaturverlauf	31
4.2.2.	Bakterienschlamm	33
4.2.3.	Huminsäure	33
4.2.4.	Reaktionswärmen	35
4.2.5.	Bewertung	36
4.3.	Versuche mit milchernährtem Bakterienschlamm aus der Versuchsanlage	37
4.3.1.	Temperaturverlauf	38
4.3.2.	Bakterienschlamm	39
4.3.3.	Huminsäure	39
4.3.4.	Reaktionswärmen	39
4.3.5.	Bewertung	40
4.4.	Zusammenfassende Diskussion der aerob-thermophilen Abbauversuche von Bakterienschlämmen	41
5.	Isolierung von Huminsäuren	46
5.1.	Isolierung aus Festkörpern	46
5.2.	Isolierung aus wässrigen Lösungen	48
5.3.	Schonende Isolierung von Huminsäuren aus Bakterienschlämmen	49
6.	Charakterisierung der Huminsäuren	54
6.1.	Elementaranalysen	54
6.2.	Infrarotspektroskopie	55
6.3.	^{1}H-NMR-Spektroskopie	57
7.	Untersuchungen zur Strukturaufklärung	60
7.1.	Extraktion mit THF/HCl	62
7.2.	Hydrolyse mit 6 n HCl	64

7.3.	Gelchromatographie	65
7.4.	Reaktionen mit Iodwasserstoffsäure	69
7.4.1.	Massenspektroskopie	72
7.4.2.	IR- und ^{1}H-NMR-Spektroskopie	73
7.4.3.	Diskussion	79
7.4.4.	^{13}C-Festkörper-NMR-Spektrum des gesamten Reaktionsgemisches	82
7.5.	Löslichkeit von Huminsäuren	84
7.6.	NMR-spektroskopische Untersuchungen	85
7.6.1.	Aromatischer Verschiebungsbereich	86
7.6.2.	Aliphatischer Verschiebungsbereich	89
7.6.3.	Polyether- und Acetalverschiebungsbereich	91
7.6.4.	Carboxyl-Verschiebungsbereich	96
7.6.5.	Kohlenstoff/Sauerstoff-Verhältnis aus den Integrationsdaten	97
7.7.	Zusammenfassende Diskussion der Untersuchungen zur Strukturaufklärung der Huminsäuren	99

III.	EXPERIMENTELLER TEIL	104
1.	Allgemeines	104
1.1.	Abkürzungen	104
1.2.	Geräte	104
2.	Abwasser- und Schlammuntersuchungen	106
2.1.	Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs	106
2.2.	Bestimmung der Schlammtrockensubstanz	107
2.3.	Bestimmung des Glührückstands	107
2.4.	Elementaranalyse	107
2.5.	Kenndaten der Versuchsanlage	108
3.	Isolierung und quantitative Bestimmung der Huminsäuren	109

3.1.	Herstellung der Ultrafiltrationsmembranen (asymmetrische Polysulfonmembranen)	109
3.2.	Isolierung und quantitative Bestimmung der Huminsäuren	109
4.	Hydrolyse mit 6 n HCl	111
5.	Reaktionen mit Iodwasserstoffsäure (57 %)	112
6.	Versuche zur Löslichkeit	114
6.1.	Methanol	114
6.2.	Dimethylsulfoxid	114
7.	IR-Spektroskopie	115
8.	NMR-Spektroskopie	116
8.1.	Messung der Substanzgemische aus den Reaktionen mit Iodwasserstoffsäure	116
8.2.	^{1}H-NMR-Spektren	116
8.3.	^{13}C-CP/MAS-NMR-Spektren	117
IV.	ZUSAMMENFASSUNG	118
V.	LITERATURVERZEICHNIS	121

I. EINLEITUNG

1. Überblick

Schon im Jahr 1760 wurden von Wallerius (1) Huminstoffe beschrieben, und aus dem Jahr 1889 stammt eine umfassende Arbeit von Hoppe-Seyler (2), der erstmals eine in vielen Aspekten auch heute noch gültige Definition dieser Substanzklasse gab. Huminsäuren sind demnach braune, amorphe Substanzen, die sich durch alkalische Extraktion aus Torf und Braunkohlen gewinnen lassen, und im Sauren unlöslich sind. Weiterhin stellte dieser Autor einen Zusammenhang zwischen dem Absterben von Pflanzen in feuchter und sauerstoffhaltiger Umgebung mit der Bildung von Huminsäuren her. Außerdem vermutete er die Umsetzung von Huminsäure zu Steinkohle und Erdöl.

Heute ist man weitgehend übereinstimmend der Auffassung, daß Huminsäuren beim Absterben von pflanzlichem und tierischem organischem Material entstehen. Es handelt sich dabei um biologisch nicht mehr oder nur schwer abbaubare komplexe organische Substanzen, deren Anteil am organisch gebundenen Kohlenstoff der Pedosphäre auf ca. 10 % geschätzt wird (3).

Je mehr man erkannte, welche Bedeutung den Huminstoffen in der modernen Landwirtschaft zufällt, desto mehr setzten sich auch zuerst Bodenkundler mit der Erforschung dieser Stoffklasse auseinander. Erst in den letzten Jahrzehnten stießen auch andere Forschungsrichtungen auf diese "braunen Pigmente", je mehr man auf die Rolle der Huminsäuren bei der Bildung fossiler Brennstoffe, auf ihre komplexierenden und chelatisierenden Eigenschaften und auf den Einfluß der Huminsäuren auf die Trinkwasserqualität und vieles andere mehr aufmerksam wurde.

1.1. Vorkommen

Die größten Huminsäure-Vorkommen bilden die Braunkohlen, deren Huminsäureanteil auf bis zu 40 % geschätzt wird; daneben sind es vor allem Moore und Torfböden, die größere Mengen an Huminsäure enthalten. Mittlerweile ist es bekannt, daß aus jedem humushaltigen Boden Huminsäure extrahierbar ist. Huminsäuren wurden in See- (4), Fluß- (5) und Meeressedimenten (6 - 11) gefunden. Huminsäuren fanden sich auch in Sedimenten, die Kerogen enthalten (dem geologischen Vorläufer von Erdöl) (12, 13).
Schon frühzeitig fand man, daß es sich bei der Braunfärbung von Moorseen und Abläufen aus Hochmoor- und Torfgebieten um gelöste Huminsäuren handelte. Mittlerweile sind in nahezu allen Arten stehender und fließender Gewässer Huminsäuren nachgewiesen und charakterisiert worden (5, 14 - 24). Huminsäuren wurden in Klärschlämmen (25 - 31) und in den Abläufen biologischer Abwasserreinigungsanlagen (27, 32 - 36) gefunden. Sogar in menschlichen Faeces wurden Huminsäuren nachgewiesen (37). Huminsäuren wurden auch als Stoffwechselprodukte von bestimmten Mikroorganismen-Reinkulturen festgestellt (38 - 42).

1.2. Entstehung

Einig ist man sich in der Auffassung, daß Huminsäuren aus den organischen Überresten pflanzlichen und tierischen Lebens entstehen. Aber schon über die Art und Weise der Bildung der Huminsäuren gehen die Meinungen weit auseinander. Während eine Lehrmeinung eine abiotische Entstehungsweise durch radikalische bzw. oxidative Polymerisation von Phenolen und Chinonen im alkalischen Milieu postuliert (43 - 45), beruht eine andere Lehrmeinung auf der Annahme, daß die Huminsäuren auf biologischem Weg durch Mikroorganismen gebildet werden, die absterbendes und abgestorbenes organi-

sches Material verwerten (46 - 48). Jedoch scheint sich die zweite Auffassung von der biologischen Entstehungsweise unter dem Einfluß von Mikroorganismen in neuerer Zeit immer mehr durchzusetzen, da eine Reihe von verschiedenen Experimenten, z.B. mit radioaktiv markierten Nährsubstraten, deutliche Beweise lieferten (48, 49). Es sind aber auch hier noch viele Fragen ungeklärt, wie z.B., ob die Bildung von Huminsäuren an bestimmte Mikroorganismen gebunden ist, ob es sich dabei ausschließlich um Aerobier handelt, oder ob es sich um extra- oder intrazelluläre Prozesse handelt.

1.3. Eigenschaften

In der Landwirtschaft werden den Huminstoffen eine Reihe von Eigenschaften zugeschrieben, die die Fruchtbarkeit und den Ertrag von Kulturböden entscheidend beeinflußen. So vermögen die Huminsäuren in einem beträchtlichen Ausmaß Metalle zu komplexieren und besitzen eine große Pufferkapazität gegenüber Säuren und Laugen. Huminsäuren adsorbieren aber auch Pestizide, Fungizide, Herbizide und Insektizide (50 - 52) und entziehen sie somit der beabsichtigten Wirkung - können sie aber auch an anderer Stelle ungewollt wieder freisetzen.
Gerade bei den in jüngster Zeit intensiv diskutierten Schadstoffimmissionen auf Waldböden darf man die Puffer- und Adsorptionskapazitäten (und deren Grenzen) der Huminsäuren nicht außer acht lassen.

Eine wichtige Rolle spielen die Huminsäuren beim Transport von oft giftigen Schwermetallen (z.B. Cadmium) in den Flußläufen (16, 28, 148, 150, 169, 170, 173, 209). Einerseits können die Schwermetalle, an Huminsäuren gebunden, aus Abwasserreinigungsanlagen ausgeschleppt und in Vorflutersedimenten abgelagert werden. Andererseits können durch unbeladene Huminsäuren eben diese sedimentierten Schwermetalle wieder remobilisiert werden und in die Nahrungskette eingehen.

Es werden von den Huminsäuren auch eine Reihe von industriellen chemischen Massenprodukten, wie Polyethylengloycole, Kunststoffweichmacher, etc., bevorzugt adsorbiert und so dem biologischen Abbau in Abwasserreinigungssystemen entzogen.

In der modernen Erdölprospektion gewinnen Huminsäuren zunehmend an Bedeutung, da es inzwischen unbestritten ist, daß aus sedimentierten Huminsäuren, an die z.B. Fettsäuren und pflanzliche Wachse adsorbiert sind, durch chemische Veränderungen in geologischen Zeiträumen Kerogen und daraus Erdöl entsteht (12).

Schon lange ist bekannt, daß bei der Chlorung von Trinkwasser durch die Reaktion des Chlors mit organischen Wasserinhaltsstoffen chlorierte Kohlenwasserstoffe entstehen können. Untersuchungen in neuerer Zeit zeigten, daß dabei vornehmlich Haloforme entstehen; in chlorierten Trinkwassern erreichte dabei das als carcinogen geltende Chloroform die höchste Konzentration. Übereinstimmend wird dabei angenommen, daß Huminsäuren die Vorläufer dieses Trihalomethans sind, das dabei nach dem Mechanismus der Haloformreaktion gebildet wird (14, 53 - 55). Ersetzt man die Chlorung durch Ozonisierung, so werden zwar die Huminsäuren weitgehend zerstört, aber z.B. daran adsorbierte Phtalester werden unzerstört freigesetzt und müssen durch aufwendige Filteranlagen entfernt werden (56, 57).

Eine interessante Anwendung der Huminsäuren bei der Entgiftung von Rauchgasen wird derzeit untersucht. Es hat sich gezeigt, daß Gemische von basischer Flugasche mit Huminsäure hervorragende Schwefeldioxid-Adsorptionskapazitäten besitzen, wobei die Huminsäure leicht regenerierbar und wieder einsetzbar ist (58).

1.4. Strukturaufklärung

Es ist bis heute nicht gelungen, dieser Klasse polymerer Naturstoffe eine einheitliche chemische Struktur zuzuordnen, da sie einerseits

standortspezifisch schon unterschiedliche Elementarzusammensetzung aufweist und andererseits mit zunehmendem Alter durch katalytische und thermische Effekte Veränderungen der Struktur erleidet. Außerdem erwies sie sich als recht unangreifbar gegenüber konventionellen chemischen Abbaumethoden, so daß man gezwungen war, aus verschiedenen chemischen und physikalischen Eigenschaften auf die chemische Struktur zurückzuschließen. Dieses deduktive Verfahren führte zu recht unterschiedlichen Ansichten über den strukturellen Aufbau der Huminsäure, die miteinander unvereinbar erschienen.

Zumeist wird angenommen, daß die Huminsäuremoleküle, denen nach neuesten, recht sinnvoll erscheinenden, Röntgenstreuungsuntersuchungen (59) ein Molekulargewicht zwischen 1.000 bis über 10.000 dalton zugesprochen wird, aus einem Kern und daran über kovalente oder Wasserstoffbrücken-Bindungen angelagerten Kohlenhydraten (24) und Proteinen (jeweils ca. 5%) bestehen (60).
Über die Struktur dieses Huminsäurekerns gingen bislang die Ansichten weit auseinander. Die Strukturvorschläge reichen von polykondensierten Aromaten bis hin zu aliphatischen Polymethylenketten. Schnitzer und Khan (1) schlugen ein über Wasserstoffbrücken dreidimensional vernüpftes Gerüst von verschieden substituierten phenolischen Carbonsäuren vor. Dem gegenüber geht ein Strukturvorschlag von Flaig und Kickuth (43) von dreidimensional miteinander vernetzten Bausteinen aus Phenolen, Chinonen, Indolen, Pyrrolen, Purin- und Pyrimidinkörpern, Phenazonen und Phenoxazonen aus. Wieder anders sieht ein Strukturvorschlag von Orlov aus (61), der Struktureinheiten mit einem Molekulargewicht von ca. 1.500 dalton vorschlägt, die Phenoxazin-, Indol- und Biphenylkörper enthalten, die über Ethylen-, Ester-, Ether- und Peptidbindungen verknüpft sind. Allen diesen Strukturvorschlägen, die auf die Ergebnisse drastischer chemischer Abbaumethoden, auf pyrolytische Spaltungen und Elektronenspinresonanzmessungen zurückgingen, war gemeinsam, daß für die Struktur des Kerns des Huminsäuremoleküls ein hoher Anteil an aromatischen und heteroaromatischen Strukturelementen angenom-

men wurde.

Erst in neuerer Zeit wurde auf Grund der ständig verbesserten Auflösung von NMR-Spektrometern immer mehr davon ausgegangen, daß die wichtigsten Strukturelemente der Huminsäuremoleküle aliphatischer Natur sein müssten, und aromatische Struktureinheiten eine mehr untergeordnete Rolle spielen. Es wurde auch erkannt, daß viele der bisher für gültig gehaltenen Annahmen bei der Strukturdisskussion auf Artefaktbildungen, durch zu drastische Isolations- und Spaltungsmethoden beruht hatten (7, 72, 119, 122, 123, 126, 127, 130 - 132, 137, 140).

2. Problemstellung

Um die Entstehung von Huminsäuren beim aerob-thermophilen Abbau von Klärschlämmen näher untersuchen zu können, sollte eine Methode entwickelt werden, diese Untersuchungen unter Laborbedingingen durchführen zu können. Um zu erkennen, in wie weit an Huminsäuren adsorbierte Verunreinigungen aus dem Abwasser stammen, sollten auch Bakterienschlämme, die mit abwasserfreien Nährmedien gezüchtet wurden, aerob-thermophil abgebaut und die dabei gebildeten Huminsäuren untersucht werden.

Durch diese Nährmedien sollte gleichzeitig erreicht werden, einseitige Mikroorganismenpopulationen in den Bakterienschlämmen zu erzeugen, um so eventuell die an der Huminsäurebildung beteiligten Mikroorganismen enger einzugrenzen.

Die aerob-thermophilen Abbauversuche sollten unter präziser Energiebilanzierung durchgeführt werden, um eventuelle Zusammenhänge zwischen thermophiler Reaktionswärme und der Huminsäurebildung zu erkennen.

Da an den gebildeten Huminsäuren Untersuchungen über ihre Eigenschaften und ihre chemische Struktur durchgeführt werden sollten, mußten schonendste Isolations- und Reinigungsmethoden eingesetzt werden. Gleichzeitig sollten auch die bei den aerob-thermophilen Abbauversuchen gebildeten Huminsäuren quantitativ bestimmt werden.

Neben der Charakterisierung der Huminsäuren durch spektroskopische Methoden, sollte versucht werden, die in der Struktur der Huminsäuren vermuteten Etherbindungen mit Jodwasserstoffsäure zu spalten.

Um weitere Fortschritte in der Strukturaufklärung der Huminsäuren zu erreichen, sollten schwerpunktmäßig NMR-spektroskopische Methoden eingesetzt werden, wie ^{1}H-NMR-Messungen an einem 400-MHz-Spektrometer und ^{13}C-NMR-Festkörper-Messungen.

II. ALLGEMEINER TEIL

1. Bildung von Huminsäuren

Es ist bekannt, daß in der biologischen Reinigungsstufe von Kläranlagen, die nach dem Belebungsverfahren arbeiten, Huminsäuren gebildet werden (33). Die Huminsäuren, die im Ablauf der Kläranlagen Konzentrationen bis zu 40 mg/l erreichen können, entstehen bei der Autolyse von Mikroorganismen im Belebtschlamm. Wird die Autolyse durch aerobe Stabilisierung oder Mineralisierung des Belebtschlammes gefördert, so entstehen auch vermehrt Huminsäuren (62). Werden Belebtschlämme unter aerob-thermophilen Bedingungen stabilisiert (Feststoffgehalt größer als 20 g/l, Temperaturen oberhalb 40°C), so können Huminsäurekonzentrationen von 1 g/l und mehr erreicht werden (35). Der Belebtschlamm baut dabei organische Trockensubstanz aus lysierten Bakterienzellen ab. Dieses Verfahren bietet sich besonders dann an, wenn man größere Mengen einheitlicher Huminsäuren gewinnen will.

Um Strukturaufklärung an Huminsäuren durchzuführen, sind besonders Huminsäuren geeignet, die frisch und nativ entstanden sind, und noch nicht durch katalytische, enzymatische und sonstige Umgebungseinflüsse verändert worden sind. Dabei erwiesen sich allerdings die Huminsäuren, die durch Autolyse von Klärschlamm-Mikroorganismen entstanden sind, zur Strukturaufklärung nur bedingt geeignet, da sie durch Abwasserinhaltsstoffe irreversibel verunreinigt sind.

Da bislang noch völlig ungeklärt war, ob bestimmte Arten von Mikroorganismen bevorzugt an der Bildung von Huminsäuren beteiligt sind, war es dringend erforderlich, die erhebliche Artenvielfalt, wie sie in den Populationen von Klärschlämmen vorliegt, durch Züchtung von einseitigen Bakterienschlämmen einzuengen. Bei An-

wendung abwasserfreier Nährmedien sind auch gleichzeitig die Verunreinigungen der Huminsäuren durch Abwasserinhaltsstoffe ausgeschlossen.

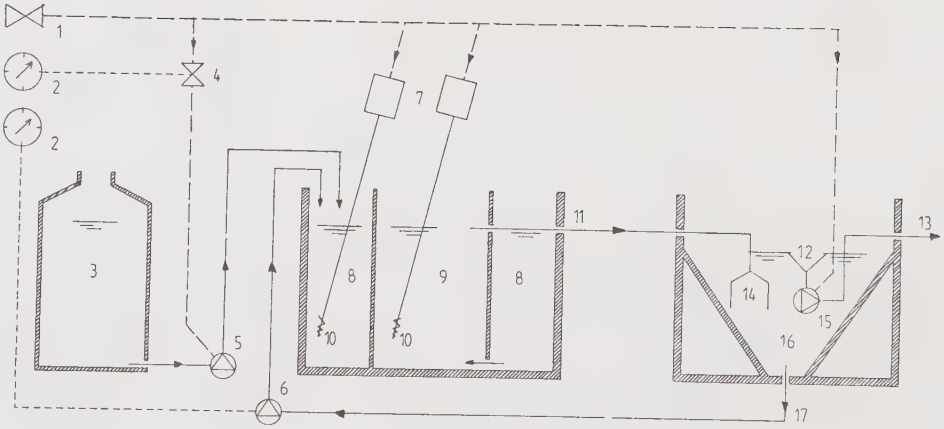
2. Gewinnung von Bakterienschlämmen

2.1. Aufbau der Versuchsanlage

Die Versuchsanlage zur Gewinnung von Bakterienschlämmen, die mit bestimmten Substraten, jedoch keinem kommunalem Abwasser, gefahren wurde, ist in Abb. 1 gezeigt. Die Anlage wurde bis auf die Anfahrzeiten im kontinuierlichen Durchlauf betrieben. Die Anlage bestand aus einem Vorratsbehälter mit 30 l Inhalt für die Nährflüssigkeit, zwei hintereinander geschalteten Belebungsbecken mit zusammen 140 l Inhalt und einem Nachklärbecken nach dem Dortmundbrunnen-Prinzip mit 46 l Inhalt. Die Behälter bestanden aus Polypropylen und PVC.

2.2. Funktionsweise

Im Vorratsbehälter 3 wurde für 24, bzw. 48 Stunden, das Substratgemisch in entsprechender Verdünnung vorgelegt. Die Zugabe ins Belebungsbecken erfolgte diskontinuierlich über eine Mammutpumpe 5, die durch eine Zeitschaltuhr 2 über ein Magnetventil 4, gesteuert wurde.
Die Bauweise mit zwei in Reihe geschalteten Belebungsbecken 8 und 9 wurde gewählt, um bei auftretenden Betriebsstörungen ein Absterben des gesamten Belebtschlammes zu verhindern. Die Belüftung und Umwälzung erfolgte mit Schneckenbelüftern (35), die zusätzlich an Druckluft angeschlossen waren.
Der Belebtschlamm gelangte durch eine Überlaufleitung 11 in den



1 Druckluftanschluß
2 Zeitschaltuhren
3 Vorratsbehälter
4 Magnetventil
5 Mammutpumpe
6 Rücklaufschlammpumpe
7 Antriebsmotoren
8 Belebungsbecken I
9 Belebungsbecken II
10 Schneckenbelüfter
11 Überlaufleitung
12 Ablauftrichter
13 Ablauf
14 Einlauftrichter
15 Mammutpumpe
16 Nachklärbecken
17 Rücklaufschlammleitung

Abb. 1: Versuchsanlage zur Gewinnung von Bakterienschlämmen

Einlauftrichter 14 des Nachklärbeckens 16, der unter dem Wasserspiegel lag und Kurzschlußströmungen verhinderte. Das vom sedimentierten Schlamm getrennte Wasser wurde mit einer Mammutpumpe 15 aus einem in das Nachklärbecken eingehängten Ablauftrichter 12 abgezogen.
Der Rücklaufschlamm wurde diskontinuierlich aus der Trichterspitze des Nachklärbeckens mit einer Kreiselpumpe 6, die über eine Zeitschaltuhr 2 gesteuert war, in das Belebungsbecken I gefördert.[1)]

2.3. Betrieb der Versuchsanlage mit Zucker als Substrat

Zum Anfahren wurde das Belebungsbecken mit Leitungswasser gefüllt und mit 1 l Belebtschlamm der Kläranlage Kirchentellinsfurt angeimpft. Täglich wurden 10 g Zucker, sowie Stickstoff- und Phosphorsalze (NH_4Cl, KH_2PO_4), zugesetzt. Nach einer Woche waren erstmals fein verteilte weißliche Flocken zu beobachten. Von hier ab mußte der pH-Wert im Belebungsbecken mit $CaCO_3$ oder NaOH regelmäßig auf 7,0 bis 8,0 eingestellt werden, um eine zu starke Hefebildung zu unterbinden.
Nach 14 Tagen betrug das Belebtschlamm-Volumen 110 ml/l, und nach 3 Wochen war das Belebtschlamm-Volumen bei ständig erhöhter Zuckerzugabe auf 950 ml/l angewachsen. Es wurde das Nachklärbecken zugeschaltet und die Anlage im kontinuierlichen Durchlaufbetrieb gefahren.
Die tägliche Zugabe an Nährlösung betrug 100 g Zucker in 30 l Leitungswasser mit Stickstoff- und Phosphorsalzen. Die Belebtschlamm-Trockensubstanz erreichte nach 4 Wochen 5,2 g/l. Die Anlage wurde nun durch wöchentlichen Überschußschlammabzug auf einem Schlamm-

---

1) Ich möchte an dieser Stelle Herrn Ehing und Herrn Walker von der Kläranlage Kirchentellinsfurt für die Möglichkeit zum Aufbau und die Unterstützung beim Betrieb der Versuchsanlage danken.

gewicht von 7 - 8 g/l gehalten. Das Belebtschlamm-Volumen betrug 950 - 990 ml/l, zeigte aber im Nachklärbecken ein gutes Absetzverhalten mit einer scharfen Trennung zwischen Wasser und Schlamm.

Der Ablauf des Nachklärbeckens wurde monatlich auf die BSB_5-Konzentration untersucht, die niemals den Wert von 10 mg/l überschritt. (Betriebsdaten der Versuchsanlage siehe Kapitel III. 3. 5.) [2)]
Der zum aerob-thermophilen Abbau benötigte Schlamm (ca. 20 l) wurde aus dem Belebungsbecken II entnommen.

2.4. Betrieb der Versuchsanlage mit Milch als Substrat

Zur Umstellung von Zucker auf Milch als Substrat wurden 10 l des zuckerernährten Belebtschlamms mit 10 l Rücklaufschlamm der Kläranlage Kirchentellinsfurt versetzt und mit Leitungswasser auf 140 l aufgefüllt. Die Versuchsanlage wurde kontinuierlich im Durchlauf betrieben und während einer Woche mit einem Gemisch von Zucker und Milch als Substrat gefahren. Dann wurden die Zuckergaben während einer weiteren Woche nach und nach durch Milch ersetzt. Weitere 2 Wochen wurde die Milchdosierung ständig bis auf 0,5 l Milch/d, verdünnt mit 30 l Leitungswasser, erhöht. Während dieser vierwöchigen Adaptionszeit mußte mehrfach der auf unter 6,0 abgesunkene pH-Wert mit Natronlauge auf Werte zwischen 7,0 und 8,0 eingestellt werden. Danach waren keine weiteren pH-Korrekturen mehr nötig.
Durch wöchentlichen Überschußschlammabzug wurde das Belebtschlammgewicht auf 6 - 7 g/l gehalten. Das Belebtschlammvolumen betrug 980 - 990 ml/l, dennoch zeigte der Belebtschlamm im Nachklärbecken ein gutes Absetzverhalten mit einer scharfen Trennung zwischen Wasser und Schlamm.

---

2) Ich danke Herrn K. Krüger für die Möglichkeit zur BSB-Messung im Labor der Kläranlage Tübingen

Der Ablauf des Nachklärbeckens wurde monatlich auf die BSB_5-Konzentration untersucht, die im Mittel bei 7 mg/l lag. (Betriebsdaten der Versuchsanlage siehe Kapitel III. 3. 5.). Der zum aerob-thermophilen Abbau benötigte Schlamm wurde ebenfalls aus dem Belebungsbecken II entnommen.

3. Aerob-thermophiler Abbau von eingedickten Klär- und Bakterienschlämmen

3.1. Aufbau des Laborreaktors

Eine maßstabsgetreue Schnittzeichnung des Laborreaktors zeigt Abbildung 2.

Ein zylinderförmiges Plexiglasgefäß mit einem Volumen von ca. 5 l stand in einem zylinderförmigen Behälter aus Pappe 22, der in den Zwischenräumen mit Styroporkugeln 23 gefüllt war. Der Reaktor konnte zu Reinigungs- und Reparaturzwecken in Boden, Wand und Deckel auseinandergenommen werden und wurde durch Stehbolzen 24 zusammengehalten.

Durch Bohrungen im Deckel war ein dünnes unten verschlossenes V2A-Rohr geführt, das zur Aufnahme eines Thermoelements diente, ein unten offenes Plexiglasrohr 18 mit Schlauchstutzen 11 zur Luftzuführung, sowie die in 2 gekapselten Kugellagern 10, oberhalb und unterhalb des Deckels befestigt, geführte Rührerachse 19. Außerdem war im Deckel die mit einem PVC-Stopfen 13 verschlossene Einfüllöffnung.

In der Reaktorwand befand sich die Abluftöffnung mit einem Schlauchstutzen 16.

Am unteren Ende der Rührerachse aus V2A war der Rührkopf 26 mit drei Leitblechen aus V2A aufgeschraubt. In der Nähe des Reaktordeckels war auf die Rührerachse ein zweiflügliger Propeller 17 aus V2A aufgeklemmt. Das im Gefäß befindliche Kugellager wurde durch

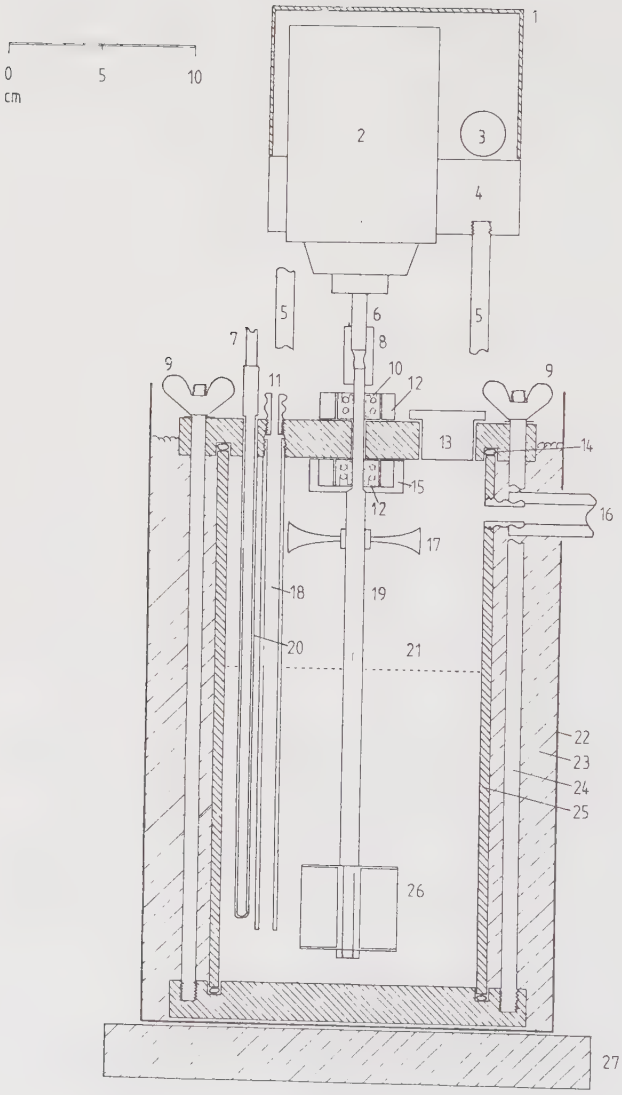


Abb. 2: Laborreaktor zum aerob-thermophilen Abbau von Klär- und Bakterienschlämmen (Legende nebenstehend)

eine zusätzliche Haube aus PVC 15 geschützt.
Auf dem Deckel des Reaktors war mit Stehbolzen 5 die Motorhalterung 4 aus Polyethylen befestigt, die einen Elektromotor (220 V, 1200 U/min) und den dazu gehörigen Kondensator 3 unter einer Schutzhaube 1 trug. Motorachse 6 und Rührerwelle waren mit einer Gummischlauchkupplung verbunden.

3.2. Funktionsweise des Laborreaktors

Durch die Einfüllöffnung wurden ca. 2,5 l auf über 25 g/l Trockensubstanz eingedickter Klär- oder Bakterienschlamm gegeben, Rührer und Luftzufuhr eingeschaltet. Die Temperatur wurde während eines gesamten Abbauversuchs durch einen mit dem Thermoelement verbundenen Schreiber registriert. Die Luftmenge konnte entsprechend dem Bedarf über ein Reduzierventil und ein Strömungs-Meßgerät eingestellt werden. Die Luft wurde in einer wassergefüllten Waschflasche gereinigt und angefeuchtet. Da die Austrittsöffnung der Luftzuführung direkt neben dem Rührkopf lag, wurden die austretenden Luftblasen sofort zerschlagen und intensiv mit dem Schlamm vermischt. Der Rührer durchwirbelte den Schlamm so kräftig, daß ständig das gesamte Schlammvolumen umgewälzt wurde.
Ein wesentliches Problem beim reibungslosen Betrieb des Reaktors bestand darin, daß der Schlamm in der Anfangsphase des sieben

---

Legende zu Abbildung 2:

1 Schutzhaube
2 Antriebsmotor
3 Kondensator
4 Motorhalterung
5 Stehbolzen zur Motorbefestigung
6 Antriebswelle
7 Thermoelement
8 Gummikupplung
9 Flügelschraube
10 Kugellager
11 Schlauchstutzen
12 Kugellagerhalterung
13 PVC-Stopfen
14 Gummidichtung
15 Schutzhaube für das Kugellager
16 Abluftschlauch
17 Propeller
18 Zuluftrohr
19 Rührerwelle
20 V2A-Rohr für das Thermoelement
21 Flüssigkeitsspiegel
22 Behälter aus Pappe
23 Styroporisolation
24 Stehbolzen
25 Reaktorwand
26 Rührkopf
27 Styroporunterlage

Tage dauernden aerob-thermophilen Abbaus sehr stark schäumte. Dadurch wurde teilweise die Abluftleitung verstopft und der Schlamm durch die Kugellager nach außen gedrückt. Dies führte dann zur Zerstörung der Kugellager binnen weniger Stunden. Abhilfe schaffte der Propeller, der im Luftraum oberhalb des Schlammspiegels auf die Rührerwelle aufgeklemmt wurde. Er drückte einen kräftigen Luftstrom nach unten und zerstörte damit die Schaumblasen. Bei sehr starkem Schäumen wurden diese Blasen direkt am Propeller zerschlagen. Gegen Kondenswasser und Schlammspritzer wurde das im Gefäß gelegene Kugellager durch eine zusätzliche Abdeckhaube geschützt. Zusätzlich wurde die Abluftleitung oberhalb des Propellers seitlich aus dem Reaktor herausgeführt, um einen direkten Luftstrom, der Schlamm hätte mitreißen können, zu verhindern.
Die Rührerachse mußte gut ausgewuchtet sein, um vibrationsfrei zu laufen; außerdem wurde zwischen Motor- und Rührerachse eine Gummikupplung gesetzt, um Vibrationen des Motors nicht weiter zu übertragen.
Unter diesen Bedingungen konnten bis zu drei Abbauversuche hintereinander durchgeführt werden, bis die Kugellager ausgewechselt und die Rührerwelle neu ausgewuchtet werden mußten.
Die Isolation durch die Styroporunterlage und die Styroporkugeln erwies sich als ausreichend, so daß auch auf eine Isolation des Deckels verzichtet werden konnte.
Das Thermoelement wurde durch mehrmaliges Messen der Schlammtemperatur mit einem Quecksilber-Thermometer geeicht. Für das Gasströmungs-Meßgerät wurde eine Eichkurve aufgenommen.

3.3. Sauerstoffbedarf

Die Luftzufuhr wurde jeweils so eingestellt, daß in der Aufheizphase ein möglichst steiler Temperaturanstieg erreicht wurde. Bei zu geringer Luftzufuhr wurde der Temperaturanstieg flacher, weil die

Reaktionswärme des Schlamms wegen Sauerstoffmangels absank. Bei zu hoher Luftzufuhr wurde der Temperaturanstieg ebenfalls geringer, weil dem System mit der Abluft zu viel Wärme durch Verdunstung und Konvektion entzogen wurde.

Bei 20 °C und 760 Torr beträgt der Sauerstoffanteil in der Luft 278 mg/l. Normalerweise kann man bei dem hier angewandten Belüftungssystem mit einer Sauerstoffausnützung von rund 10 % rechnen, also etwa 28 mg O_2/l Luft.

Im Minimalfall wurden für einen Schlamm mit 29,1 g TS/l je Stunde 56,4 l Luft eingeblasen. Mit einer Tagesmenge von 1354 l Luft standen 65,2 g org. TS des Schlamms 376 g Sauerstoff zur Verfügung, bei 10 %-iger Ausnutzung waren das etwa 38 g O_2/d. Damit errechnet sich ein Sauerstoffbedarf von rund 0,6 g O_2/g org. TS x d.

Im Maximalfall wurden für einen Schlamm mit 72,3 g TS/l je Stunde 84,4 l Luft benötigt. Von den im Reaktor befindlichen 124,6 g org. TS konnten somit etwa 56 g O_2/d ausgenutzt werden. Das ergab für den Sauerstoffbedarf einen Wert von 0,5 g O_2/g org. TS x d.

Nach Müller-Neuhaus muß beim aerob-thermophilen Klärschlammabbau mit einem Sauerstoffbedarf von etwa 0,7 g O_2/g org. TS x d gerechnet werden. Die hier ermittelten Werte für den Sauerstoffbedarf erreichten nicht ganz diesen Richtwert. Dies lag einerseits an der sehr effektiven Belüftung und andererseits an der temperaturorientierten Einstellung der Luftzufuhr; jedoch war jederzeit eine aerobe Versuchsführung gewährleistet.

3.4. Energiebilanz

Um eine präzise Energiebilanzierung durchführen zu können, wurden mit fertig aerob-thermophil abgebautem und stabilisiertem Schlamm bei laufender Luftzufuhr von 60 l/h zwei Meßreihen aufgenommen. Einmal beginnend bei 20 °C mit laufendem Rührwerk wurde fortlaufend die Temperatur gemessen (Abb. 3, Meßpunkte I), denn der Rührer

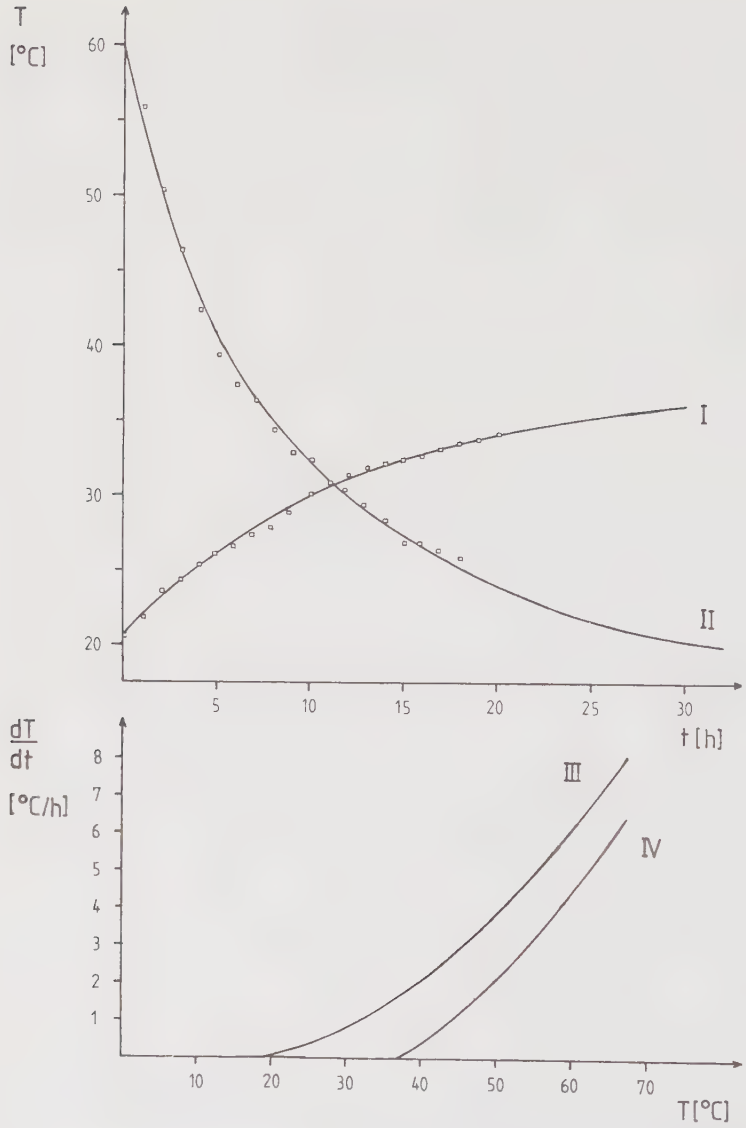


Abb. 3: Temperaturkurven (I Aufheizkurve mit Rührer, II Abkühlkurve ohne Rührer, III/IV stündlicher Temperaturverlust ohne/mit Rührer)

arbeitete so intensiv, daß sich das System erwärmte. Bei 37 °C stellte sich das Temperaturgleichgewicht zwischen Wärmeeintrag und Wärmeverlust an die Umgebung ein.

Zum Anderen wurde auf 60 °C erwärmter, fertig aerob-thermophil abgebauter, Schlamm vorgelegt und bei abgeschaltetem Rührwerk fortlaufend die Temperatur gemessen (Abb. 3, Meßpunkte II).

An die Meßpunkte beider Meßreihen wurde jeweils rechnerisch, nach dem Prinzip der Minimierung der Summe der Abstandsquadrate, eine Kurvenfunktion angepaßt:

$$T = f(t)$$

Aus der Steigung der Aufheizkurvenfunktion (Abb. 3, I) konnte bei $T = 20\ ^{\circ}C$ und $t = 0$ h aus

$$m = f'(t_0)$$

der Energieeintrag des Rührwerks ermittelt werden, da ja bei Raumtemperatur keine Wärmeverluste des Systems berücksichtigt werden müssen. Die Wärmeerzeugung des Rührwerks betrug:

$$1{,}4\ ^{\circ}C/h \text{ entsprechend } 3{,}5 \text{ kcal/h bzw. } 14{,}6 \text{ kJ/h}$$

Aus der Steigung der Abkühlkurvenfunktion (Abb. 3, II) konnte zu jeder Reaktortemperatur T_i der Energieverlust des Systems an die Umgebung berechnet werden.

Aus diesen Berechnungen ging hervor, daß sich Energieverlust an die Umgebung und Energieeintrag durch das Rührwerk gerade bei einer Temperatur von 37 °C ausgleichen müssten, was genau mit den tatsächlich gemessenen Verhältnissen übereinstimmte.

Der Energieverlust des Systems an die Umgebung ist in Abb. 3, III als stündliche Temperaturabnahme in Abhängigkeit der Reaktortemperatur dargestellt. Die Kurve IV stellt den Energieverlust bei eingeschaltetem Rührwerk dar.

Somit konnte für jeden aerob-thermophilen Abbauversuch durch Aufsummierung der stündlichen Erwärmung (bzw. Abkühlung) zuzüglich des stündlichen Energieverlusts bei der entsprechenden Temperatur unter Berücksichtigung der vom Rührwerk eingetragenen Wärmemenge die Gesamtreaktionswärme bestimmt werden.

4. Versuchsdurchführung

Es wurden drei Versuchsreihen mit verschiedenen Schlammarten durchgeführt:

1. Rücklaufschlamm der Kläranlagen Kirchentellinsfurt, bzw. Tübingen
2. Mit Zuckerlösung ernährter Belebtschlamm aus der Versuchsanlage
3. Mit Milch ernährter Belebtschlamm aus der Versuchsanlage

Die Bakterienschlämme wurden jeweils unmittelbar nach der Entnahme im Labor eingedickt. Ausgehend von 5 - 8 g/l TS wurde durch Filtration über grobporige Faltenfilter Schlammkonzentrationen von 29 bis 72 g/l TS erreicht. Sedimentation in Standzylindern erwies sich als weniger geeignet, da nach 24 Stunden erst 20 g/l TS erreicht wurde, und dann die Bakterienschlämme zum Teil schon in Faulung übergingen. Zusatz von Flockungshilfsmitteln war natürlich nicht möglich, da diese Polymere dann die gewünschte reine Huminsäure verunreinigt hätten. Die Filtration war meist nach 3 Stunden beendet. Dann wurden die eingedickten Schlämme in den Laborreaktor zum aerob-thermophilen Abbau gegeben.
Folgende Parameter wurden gemessen:

Für den Bakterienschlamm vor Versuchsbeginn und nach Versuchsende:

- Trockensubstanz TS
- Glührückstand GR
- Elementaranalyse

Während des Versuchs:

- Luftzufuhr
- Temperaturverlauf

Für die gebildete Huminsäure nach Versuchsende:

- Huminsäurekonzentration
- Glührückstand GR

Elementaranalyse

Aus diesen Meßdaten wurden folgende Größen berechnet:

TS_{org}	organische Trockensubstanz (berechnet aus TS - GR)
ΔTS_{org}	Abnahme der organischen Trockensubstanz während des Versuchs (berechnet aus der Differenz von TS_{org} vor und nach dem Versuch)
Q_{ges}	Gesamtreaktionswärme (berechnet aus der Temperaturkurve)
Q_{spez}	spezifische Reaktionswärme Wärmemenge pro Gramm abgebauter organischer Trockensubstanz (berechnet aus $Q_{ges}/\Delta TS_{org}$)
$HS/\Delta TS_{org}$	Huminsäure-Ausbeute pro Gramm abgebauter organischer Trockensubstanz

4.1. Versuche mit Klärschlamm kommunaler Kläranlagen

Über einen längeren Zeitraum hinweg wurden Belebtschlämme der Kläranlage der Gemeinde Kirchentellinsfurt im Laborreaktor aerob-thermophil abgebaut, und auf die gebildete Huminsäurekonzentration untersucht.

Das Klärwerk Kirchentellinsfurt eignete sich besonders für solche Untersuchungen, da dort weitgehend kommunales Abwasser mit nur geringen industriellen Anteilen anfällt. Allerdings konnte im Lauf der Abbauversuche beobachtet werden, wie sich die Schlammeigenschaften gravierend veränderten - und damit auch die Ergebnisse des aerob-thermophilen Abbaus beeinflußten. Zum Vergleich wurde noch ein Belebtschlamm der Kläranlage Tübingen herangezogen.

V-Nr.	Bakterienschlamm							Huminsäure					
	TS g/l	GR %	C %	H %	N %	S %	O %	GR %	C %	H %	N %	S %	O %
V 11	43,44	28,10	51,71	7,50	7,27	-	33,52	8,68	38,32	5,54	5,48	4,62	46,05
	30,56	37,68	50,67	7,59	7,41	1,68	32,64						
V 13	43,94	39,74	63,31	10,31	12,68	7,52	6,19	7,52	36,20	5,97	6,81	4,49	46,53
	23,75	39,18	51,05	7,69	6,69	1,41	33,23						
V 14	29,1	10,40	50,67	8,29	8,93	0,71	31,39	12,77	37,14	4,92	5,39	3,67	48,88
	24,4	28,58	36,78	5,42	6,03	-	51,76						
V 15	72,2	30,0	-	-	-	-	-	1,21	37,14	3,73	3,68	2,45	53,00
	60,12	39,31	54,82	8,44	7,78	1,83	27,14						
V 19	72,3	31,03	55,86	8,83	11,25	0,49	23,57	6,53	43,10	6,58	6,03	1,78	42,49
	40,1	42,94	47,41	7,39	7,39	0,91	36,89						
V 22	47,8	29,17	54,20	8,37	10,59	0,82	26,02	10,39	43,29	6,00	4,77	1,99	43,96
	30,2	38,23	45,60	6,99	7,85	1,60	37,05						
V 23	45,0	39,06	57,96	8,82	11,33	2,23	19,66	13,74	45,95	5,47	5,92	3,33	39,33
	20,3	32,56	57,86	11,18	9,64	3,02	18,30						

Tabelle 1: Meßergebnisse der aerob-thermophilen Abbauversuche mit Klärschlämmen

V-Nr.	TS_{org}	ΔTS_{org}		T_{max}	Q_{ges}	Q_{spez}	HS	$\frac{HS}{\Delta TS_{org}}$
	g/l	g/l	%	°C	kcal/l	kcal/g	g/l	%
V 11	31,23	12,19	39,0	59,5	103,0	8,4	1,40	22,7
V 13	26,48	12,03	45,4	58,5	155,4	12,9	1,75	14,5
V 14	26,07	8,65	33,2	46,0	-	-	1,00	11,6
V 15	50,54	14,05	27,8	64,5	144,9	10,3	1,076	7,7
V 19	49,86	26,98	54,1	55,6	122,2	4,5	0,556	2,1
V 22	33,86	15,2	44,9	49,7	75,6	5,0	0,298	2,0
V 23	27,42	13,73	50,1	50,0	61,9	4,5	0,44	3,2

Tabelle 2: Meßdaten und berechnete Werte der aerob-thermophilen Abbauversuche mit Klärschlämmen

4.1.1. Temperaturverlauf

Der für den aerob-thermophilen Abbau von Klärschlamm typische Temperaturverlauf ist in Abb. 4 an Hand des Abbauversuchs V 13 dargestellt.

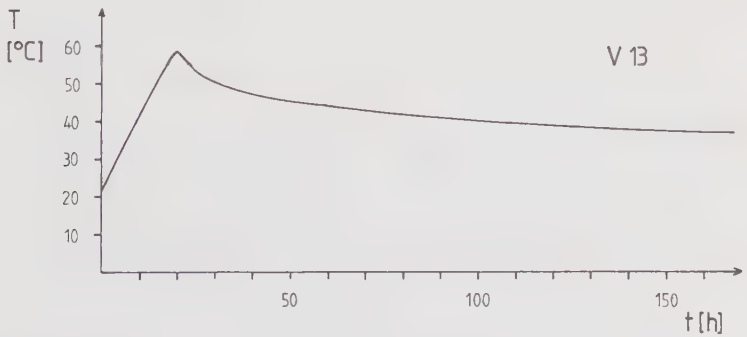


Abb. 4: Temperaturverlauf beim aerob-thermophilen Abbau von Klärschlamm (am Beispiel des Versuchs V 13)

Nach dem Versuchsstart im Laborreaktor wurde sehr rasch nach 18 bis 38 Stunden das Temperaturmaximum erreicht. In weiteren 10 bis 20 Stunden sank die Temperatur ebenso rasch wieder ab, um dann langsam bis zur Ausgleichstemperatur von 37 °C weiter zu sinken. Diese Endtemperatur wurde nach 90 - 150 Stunden erreicht.
Das bedeutete, daß der aerob-thermophile Prozess spätestens nach 150 Stunden abgeschlossen war. Wegen der Vergleichbarkeit der Abbauversuche wurde jeweils eine Versuchsdauer von 7 Tagen (168 h) eingehalten.
Als Maximaltemperaturen wurden zwischen 46,0 und 64,5 °C erreicht; damit lagen alle Versuche deutlich im thermophilen Bereich. Die erreichte Maximaltemperatur zeigte eine gewisse Abhängigkeit von der Schlammanfangskonzentration (TS_{org}) (s. Abb. 5). Es galt grob: Je höher die organische Schlammtrockensubstanz zu Versuchsbeginn lag, desto höher war auch die erreichbare Maximaltemperatur (T_{max}).

4.1.2. Bakterienschlamm

Bei einer Schlammkonzentration von rund 72 g/l TS zu Versuchsbeginn war eine Obergrenze erreicht, die sich im Laborreaktor gerade noch verarbeiten ließ. Bei noch höheren Konzentrationen wären nur noch die Schlammanteile in unmittelbarer Umgebung des Rührers umgewälzt und belüftet worden.
Mit der Abnahme der organischen Trockensubstanz im Laufe des aerob-thermophilen Abbaus ging in der Regel eine Zunahme des Glührückstands einher; der Schlamm wurde "mineralisiert".
Diese biologische Oxidation des Bakterienschlamms wird von den Werten der Elementaranalyse bestätigt; einer Abnahme der Kohlenstoff-, Stickstoff- und Wasserstoffwerte steht eine starke Zunahme des Sauerstoffgehalts der organischen Trockensubstanz gegenüber. Lediglich der Versuch mit Tübinger Klärschlamm (V 23) erbrachte

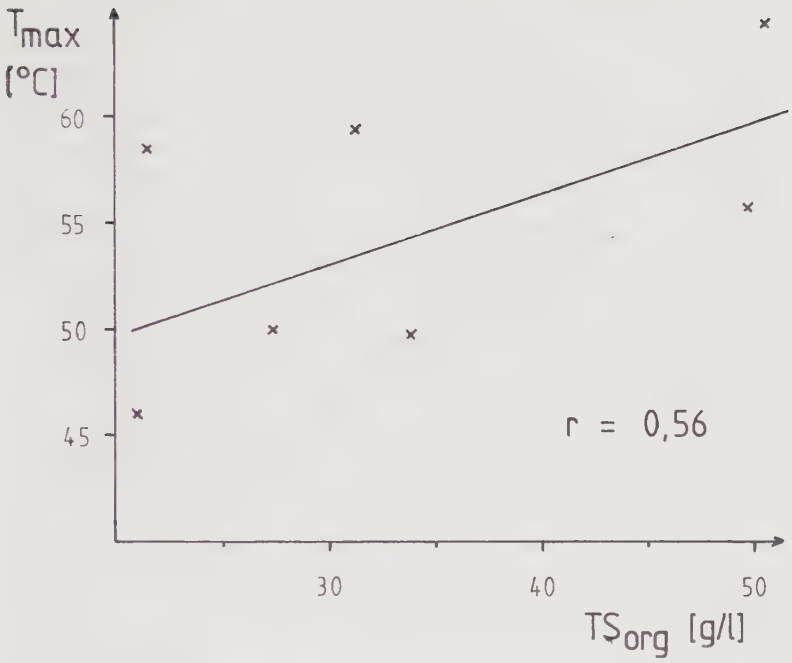


Abb. 5: Abhängigkeit der Maximaltemperatur von der Schlammkonzentration zu Versuchsbeginn

hiervon abweichende Werte. Sie müssen als für biologische Versuche typischer Ausreißer gewertet werden.

Kohlenstoff und Wasserstoff in den organischen Verbindungen des Bakterienschlamms wurde im Versuchsverlauf oxidiert, wohingegen Stickstoff zum Teil als Ammoniak aus dem System abgeführt wurde; häufig trat in der Abluft ein schwacher Ammoniak-Geruch auf.

Die pH-Werte während des Abbaus schwankten zwischen 7,0 und 9,0, wurden aber nicht regelmäßig verfolgt.

4.1.3. Huminsäure

Die Huminsäurekonzentrationen nach Ende der aerob-thermophilen Abbauversuche lagen zwischen 0,30 und 2,77 g/l, das entsprach einer Huminsäureausbeute zwischen 2,0 und 22,7 % je Gramm abgebauter organischer Trockensubstanz.
Diese Zahlen zeigten kaum Zusammenhänge mit der erreichten Maximaltemperatur oder der Schlammkonzentration zu Versuchsbeginn.
Die Werte der Elementaranalysen der einzelnen Huminsäuren schwankten in einem relativ engen Rahmen und entsprachen den schon früher gefundenen Werten für Huminsäuren aus Abwasser und Klärschlämmen.
Damit war es gelungen, auf kleinstem Raum im Labor native Huminsäuren in erheblichen Mengen zu erzeugen.

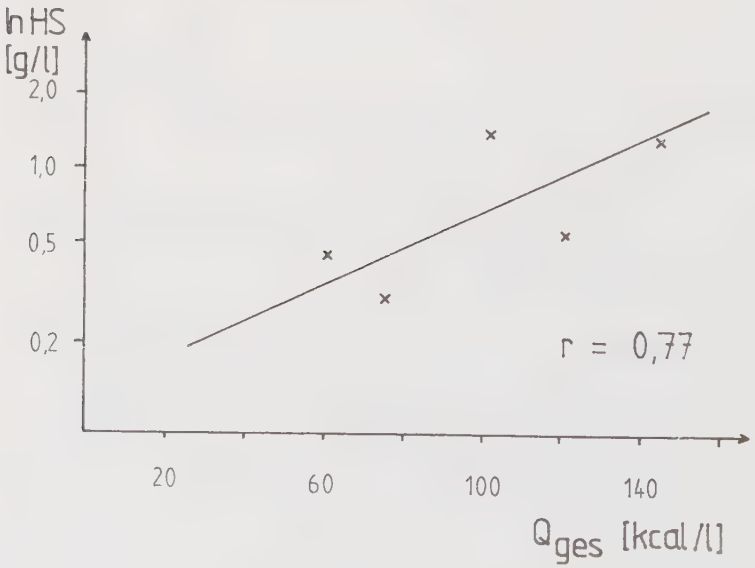


Abb. 6: Abhängigkeit der Huminsäurekonzentration von der Gesamtreaktionswärme beim Abbau von Klärschlämmen

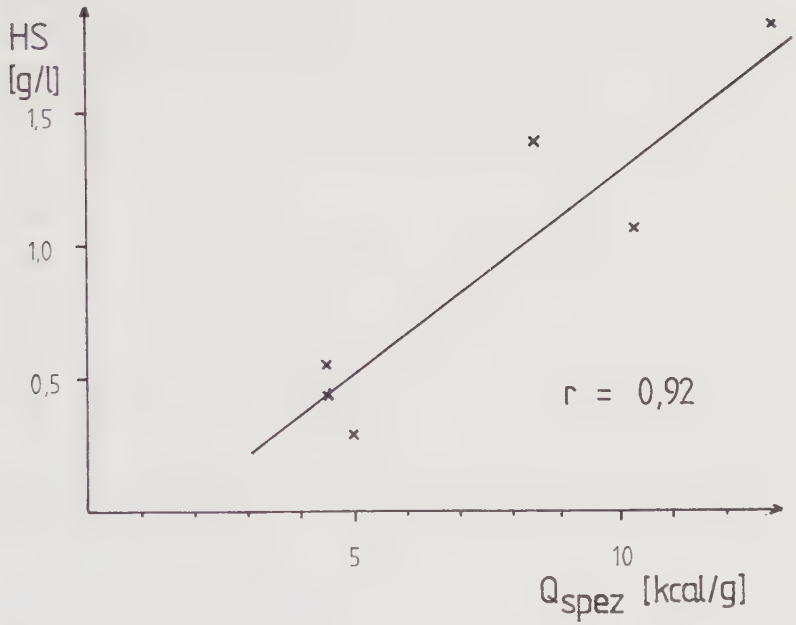


Abb. 7: Abhängigkeit der Huminsäurekonzentration von der Reaktionswärme pro Gramm abgebauter organischer Trockensubstanz beim Abbau von Klärschlämmen

4.1.4. Reaktionswärmen

Die Gesamtreaktionswärmen lagen zwischen 61,9 und 155,4 kcal/l. Pro Gramm abgebauter organischer Trockensubstanz wurden Werte zwischen 4,5 und 12,9 kcal/g erhalten.

Für die Abhängigkeit der Huminsäurekonzentration von der Gesamtreaktionswärme wurde ein exponentieller Zusammenhang gefunden (Abb. 6). Es ergab sich für

$$\ln HS = f(Q_{ges})$$

ein Korrelationskoeffizient von r = 0,77.

Es zeigte sich ein deutlicher linearer Zusammenhang zwischen Huminsäurekonzentration und spezifischer Reaktionswärme (Abb. 7). Es galt für:

$$HS = f(Q_{spez})$$

$$r = 0,92$$

4.1.5. Bewertung

Nach bisherigen Erfahrungen (35) wären Zusammenhänge zwischen Schlammkonzentration zu Versuchsbeginn und erreichter Maximaltemperatur, bzw. zwischen der Abnahme an organischer Trockensubstanz und der Huminsäureausbeute zu erwarten gewesen. Daß diese Zusammenhänge bei den vorliegenden Untersuchungen nicht gefunden wurden, findet seine Erklärung darin, daß sich die Verhältnisse auf der Kläranlage Kirchentellinsfurt im Versuchszeitraum von rund eineinhalb Jahren stark veränderten.

Die ersten Versuche zeigten noch die gleichen Absolutwerte, wie sie auch von Jahns (35) ermittelt worden sind, doch dann gingen zuerst die Huminsäureausbeuten und dann später auch noch die Gesamtverbrennungswärmen stark zurück.

Das Kirchentellinsfurter Abwasser wird von einigen nur saisonweise arbeitenden Betrieben (wie Brennereien) zeitweise sehr stark belastet, so daß sich bei einer erheblichen Überlastung der biologischen Reinigungsstufe sich die Eigenschaften des Belebtschlamms in Richtung auf einen hell gefärbten, sehr leichten und schwer absetzbaren Schlamm veränderten. In der Folge erholte sich der Belebtschlamm von diesen Veränderungen, auch bei wieder verringerter Belastung, nicht mehr und nahm immer mehr die Charakterzüge eines Blähschlammes an, wenn auch im mikroskopischen Bild weitgehend fadenförmige Mikroorganismen fehlten.

Diese Veränderungen spiegelten sich in der Reihe der aerob-thermo-

philen Abbauversuche deutlich wieder. In der Überlastungsphase des Kirchentellinsfurter Belebtschlamms gingen die Huminsäurekonzentrationen zurück (V 13, V14, V 15). in der späteren Phase wieder verringerter Belastung, aber schlechter Schlammqualität, ließ der thermophile Effekt nach und auch die Gesamtreaktionswärmen sanken ab.
Andererseits wurden durch die sorgfältige Beobachtung der Reaktionswärmen Zusammenhänge gefunden, die eine allgemeinere Gültigkeit auch für veränderte Bakterienschlämme haben.
Die Bildung, bzw. Freisetzung von Huminsäuren beim aerob-thermophilen Abbau von Klärschlämmen scheint sehr eng mit der Reaktionswärme gekoppelt zu sein: einerseits steigt die Huminsäurekonzentration linear mit der Zunahme der Reaktionswärme pro Gramm abgebauter Trockensubstanz, andererseits steigt die Huminsäurekonzentration exponentiell mit der Zunahme der Gesamtreaktionswärme.

Diese Beobachtung lässt einen wichtigen Schluß zur Entstehung von Huminsäuren beim aerob-thermophilen Abbau von Klärschlämmen zu:

1. Die Entstehung oder Freisetzung von Huminsäuren ist direkt mit dem thermophilen Effekt verknüpft.

2. Das Vorhandensein immer gleich großer Mengen an thermophilen Mikroorganismen in Belebtschlämmen ist nicht zwingend, und damit auch nicht die Bildung von Huminsäuren.

4.2. Versuche mit zuckerernährtem Bakterienschlamm aus der Versuchsanlage

Jeweils zwei Tage vor Entnahme des Bakterienschlamms aus der Versuchsanlage wurde die Zuckerzufuhr eingestellt und nur noch Wasser zugegeben, um möglichst wenig vom Zulauf verunreinigten

V-Nr.	Bakterienschlamm							Huminsäure					
	TS g/l	GR %	C %	H %	N %	S %	O %	GR %	C %	H %	N %	S %	O %
V 10	43,88	20,73	46,87	6,67	8,98	0	37,48	-	-	-	-	-	-
	30,90	28,31	44,85	6,54	7,85	0	40,76						
V 17	58,06	14,62	48,27	7,18	5,01	-	39,54	11,53	38,93	6,31	2,60	2,36	49,80
	40,0	19,28	42,54	6,13	4,81	-	46,52						
V 12	42,12	17,11	48,11	7,20	9,17	0,60	34,91	9,09	35,67	6,36	4,04	2,68	47,68
	27,41	21,65	47,05	7,24	8,02	1,65	36,06						
V 18	67,04	13,45	48,28	6,85	4,45	0,13	40,27	14,59	40,06	5,37	3,96	2,52	47,69
	43,2	17,10	41,66	6,44	4,13	1,56	45,21						
V 20	46,2	15,93	49,08	7,30	9,12	0,54	33,96	11,02	39,95	5,48	6,82	0,61	47,74
	31,2	19,25	40,78	2,55	13,66	3,06	39,95						
V 21	51,7	28,25	48,13	6,12	8,07	-	37,69	18,79	41,94	5,64	6,70	-	45,72
	41,0	29,22	38,50	4,44	5,61	-	51,46						

Tabelle 3 und 4: Meßwerte der aerob-thermophilen Abbauversuche mit zucker- (oben) und milchernährten (unten) Bakterienschlämmen

V-Nr.	TS_{org}	ΔTS_{org}		T_{max}	Q_{ges}	Q_{spez}	HS	$\frac{HS}{\Delta TS_{org}}$
	g/l	g/l	%	°C	kcal/l	kcal/g	g/l	%
V 10	34,78	12,63	36,3	42,0	34,1	2,7	0,2	1,6
V 17	49,57	17,75	39,8	45,2	56,2	3,2	0,25	1,4
V 12	34,9	13,44	38,5	51,0	137,6	10,2	1,65	12,3
V 18	58,02	22,20	38,3	44,0	111,4	5,0	0,81	3,6

Tabelle 5: Meßdaten und berechnete Werte der aerob-thermophilen Abbauversuche mit zuckerernährtem Bakterienschlamm

Schlamm zu erhalten.
Wegen des geringen thermophilen Effekts und der geringen Huminsäureausbeute wurden auch Abbauversuche gefahren, die mit schon aerob-thermophil abgebautem Schlamm angeimpft wurden. Es wurden jeweils 200 ml Impfschlamm zugesetzt. Insgesamt vier Versuche mit zuckerernährtem Schlamm wurden durchgeführt:

V 10 nicht angeimpft
V 17 nicht angeimpft
V 12 angeimpft mit aerob-thermophil abgebautem Schlamm aus Versuch V 11
V 18 angeimpft mit aerob-thermophil abgebautem zuckerernährtem Schlamm aus Versuch V 17

4.2.1. Temperaturverlauf

(s. Abb. 8). Im ersten Versuch (V 10) kam der thermophile Prozess nur sehr zögernd nach etwa zwei Tagen in Gang. Erst nach 115 Stunden konnte das Temperaturmaximum mit 42,0 °C erreicht werden. Auch die niedrige Gesamtreaktionswärme von 34,1 kcal/l wies auf den niedrigen thermophilen Effekt hin.

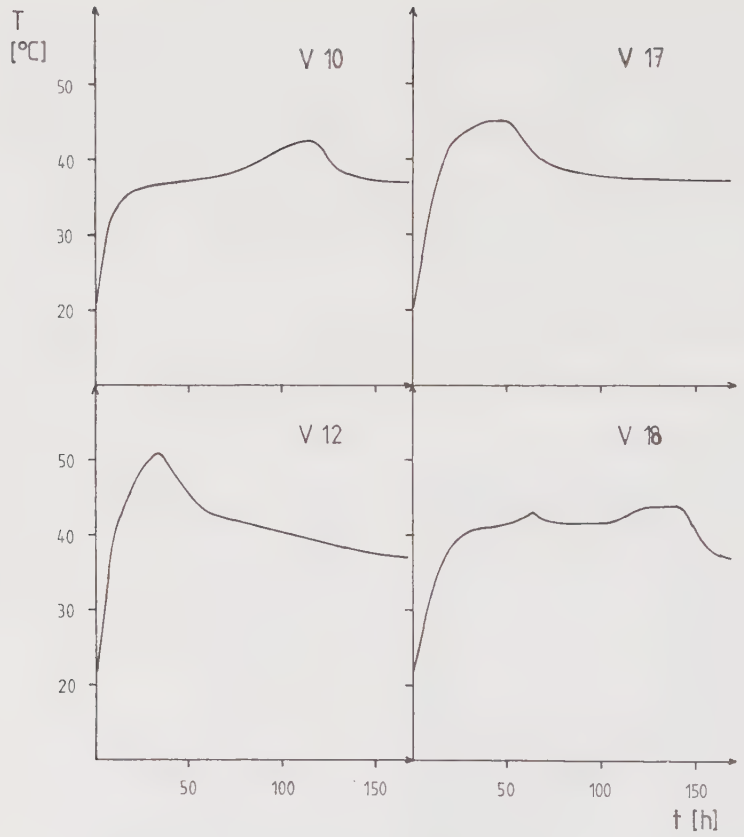


Abb. 8: Temperaturverlauf bei den aerob-thermophilen Abbauversuchen mit zuckerernährten Schlämmen (unten angeimpft)

Im zweiten Versuch (V 17) wurde sehr viel schneller der thermophile Bereich (schon nach 40 h) und auch die Maximaltemperatur mit 45,2 °C erreicht. Wegen des darauf folgenden schnellen Absinkens der Temperatur blieb auch hier der thermophile Effekt gering. Durch Animpfen mit aerob-thermophil abgebautem Klärschlamm wurde in einem weiteren Versuch (V 12) ein normaler Temperaturverlauf (entsprechend den Abbauversuchen mit Klärschlamm) erhal-

ten. Die Maximaltemperatur lag bei 51,0 °C. Aber auch hier lag die Gesamtreaktionswärme von 137,6 kcal/l noch unter den mit Klärschlamm erzielten Werten.
Im letzten Versuch (V 18) wurde mit zuckerernährtem, fertig aerob-thermophil abgebautem Schlamm aus Versuch V 17 angeimpft. Der Temperaturverlauf führte zwar schnell in den thermophilen Bereich, jedoch wurde neben einem ersten Temperaturmaximum nach 65 Stunden mit 42,4 °C die eigentliche Maximaltemperatur mit 44,0 °C erst nach 132 Stunden erreicht. Trotz einer höheren Schlammkonzentration zu Versuchsbeginn gegenüber dem ersten angeimpften Abbauversuch (V 12) lag die Gesamtreaktionswärme mit 111,4 kcal/l niedriger.

4.2.2. Bakterienschlamm

Der mit Zucker ernährte Schlamm zeigte in allen vier Versuchen nahezu gleiche Werte in der Elementaranalyse, lediglich die Glührückstände gingen mit der Zeit zurück. Das war darauf zurückzuführen, daß der pH-Wert des Bakterienschlamms anfangs mit $CaCO_3$ und erst später mit NaOH eingestellt wurde.
Bei den Versuchen nahm die organische Trockensubstanz bei den nicht angeimpften Versuchen im Mittel um 36,0 % und bei den angeimpften Versuchen im Mittel um 38,4 % ab. Die minimalen Abweichungen von den Mittelwerten zeigen die gute Vergleichbarkeit der Abbauversuche und die konstanten Verhältnisse der Schlammeigenschaften.

4.2.3. Huminsäure

Die Huminsäurekonzentration bei Beendigung der nicht angeimpften Abbauversuche lag im Mittel bei 1,5 % je Gramm Δ TS_{org}, und da-

mit sehr niedrig. Erheblich höher lagen die Huminsäurekonzentrationen bei den angeimpften Abbauversuchen, insbesondere bei dem Versuch, der mit abgebautem Kirchentellinsfurter Belebtschlamm angeimpft worden war. Hier lag die Huminsäureausbeute mit 12,3 % je Gramm Δ TS_{org} in der Größenordnung der Klärschlammabbauversuche mit hoher Huminsäurekonzentration (V 11 - V 14).
Die Elementaranalysen der Huminsäuren lagen im Rahmen der üblichen Werte. Lediglich die Stickstoffgehalte mit durchschnittlich weniger als 4 % N lagen unter den sonst gefundenen Werten von ca. 6 % N.

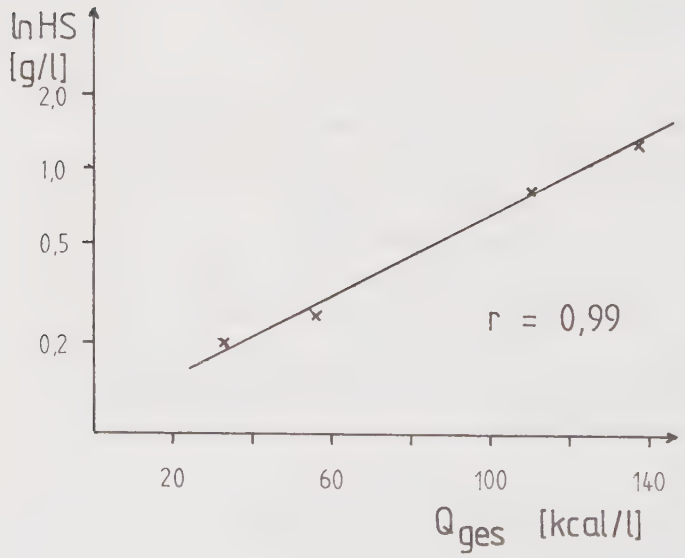


Abb. 9: Abhängigkeit der Huminsäurekonzentration von der Gesamtreaktionswärme beim Abbau von zuckerernährten Bakterienschlämmen

4.2.4. Reaktionswärmen

Die Gesamtreaktionswärmen lagen bei den nicht angeimpften Abbauversuchen (V 10, V 17) mit 34,1 und 56,2 kcal/l recht niedrig, während sich die Reaktionswärmen der angeimpften Abbauversuche (V 12, V 18) mit 114,4 bzw. 137,6 kcal/l mit denen der Abbauversuche von Kirchentellinsfurter Klärschlamm vergleichen ließen. Dasselbe Bild ergab sich für die spezifischen Reaktionswärmen. Für die nicht angeimpften Abbauversuche wurden um 3 kcal/g ΔTS_{org}, für die angeimpften Abbauversuche 5 und 10 kcal/g ΔTS_{org} gefunden.

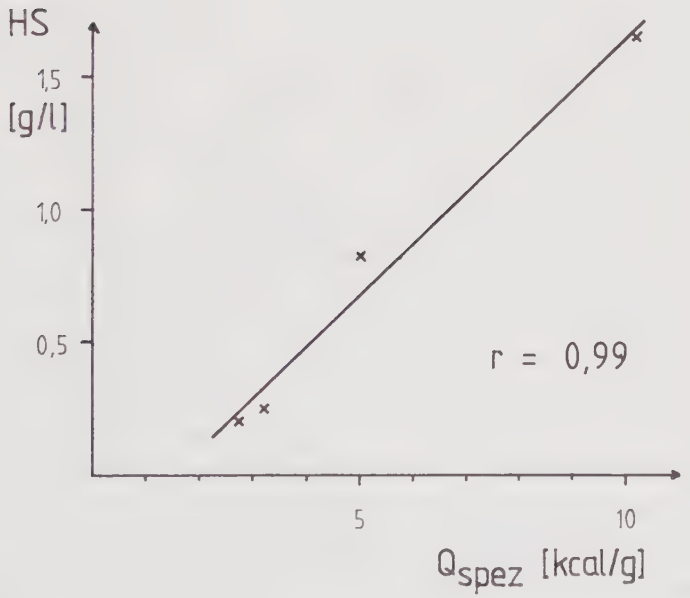


Abb. 10: Abhängigkeit der Huminsäureausbeute von der spezifischen Reaktionswärme beim Abbau von zuckerernährten Bakterienschlämmen

Für die Zusammmenhänge von Huminsäureausbeute und Reaktionswärmen ergaben sich folgende Funktionen und Korrelationskoeffizienten (s. Abb. 9 und 10):

$$\ln HS = f(Q_{ges})$$
$$r = 0,99$$

$$HS = f(Q_{spez})$$
$$r = 0,99$$

4.2.5. Bewertung

Mit reinem zuckerernährtem Bakterienschlamm ließ sich nur ein geringer thermophiler Effekt beim aerob-thermophilen Abbau erzielen. Ebenso war die Huminsäureausbeute gering.
Wie die Temperaturkurven zeigten, trat der thermophile Effekt nur zögernd ein. Offensichtlich enthielt der zuckerernährte Bakterienschlamm kaum thermophile Mikroorganismen.
Beim Animpfen mit fertig abgebautem Klärschlamm war der Temperaturverlauf normal, und auch Huminsäureausbeute und Reaktionswärme waren fast normal hoch.
Beim Animpfen mit fertig abgebautem zuckerernährtem Bakterienschlamm wurden zwar ebenfalls höhere Huminsäurekonzentration und Reaktionswärme registriert, aber der Temperaturanstieg ergab sich zögernd und in zwei Etappen. Offensichtlich war die Zahl der im ungeimpften Abbauversuch gebildeten thermophilen Mikroorganismen immer noch gering und wurden zudem im Verlauf des Versuchs möglicherweise durch eine andere Art überlagert (zweites Temperaturmaximum).
Es bestätigte sich in den Abbauversuchen mit zuckerernährten Bakterienschlämmen verstärkt, daß nicht unbedingt jede klärschlammähnliche Bakterienpopulation aerob-thermophil abgebaut werden kann, und daß in diesen Populationen thermophile Mikroorganismen

nicht zwingend vorliegen müssen.
Dennoch findet bei den Abbauversuchen mit zuckerernährtem Bakterienschlamm der Abbau organischer Trockensubstanz in normaler Höhe statt (36 - 40 %), offensichtlich unabhängig vom thermophilen Effekt.
Der lineare Zusammenhang zwischen der Reaktionswärme pro Gramm abgebauter organischer Trockensubstanz und der Bildung von Huminsäure erreichte bei dieser Versuchsreihe die sehr große Korrelation von r = 0,99.
Auch die exponentielle Zunahme der Huminsäureausbeute bei Zunahme der Gesamtreaktionswärme fand mit einem Korrelationskoeffizienten von ebenfalls r = 0,99 ausdrückliche Bestätigung.

4.3. Versuche mit milchernährtem Bakterienschlamm aus der Versuchsanlage

Jeweils zwei Tage vor Entnahme des Bakterienschlamms aus der Versuchsanlage wurde die Milchzufuhr eingestellt und nur noch Wasser zugegeben, um eine möglichst wenig vom Zulauf verunreinigte Huminsäure nach dem aerob-thermophilen Abbau zu erhalten.
Es wurden zwei Abbauversuche durchgeführt (V 20, V 21).
(Einzeldaten siehe Tabelle 4 und 6)

V-Nr.	TS_{org}	ΔTS_{org}		T_{max}	Q_{ges}	Q_{spez}	HS	$\frac{HS}{\Delta TS_{org}}$
	g/l	g/l	%	°C	kcal/l	kcal/l	g/l	%
V 20	38,84	13,65	35,1	45,0	80,4	5,9	0,897	6,6
V 21	37,09	8,07	21,8	45,0	47,1	5,8	0,472	5,8

Tabelle 6: Meßdaten und berechnete Werte der aerob-thermophilen Abbauversuche mit milchernährtem Bakterienschlamm

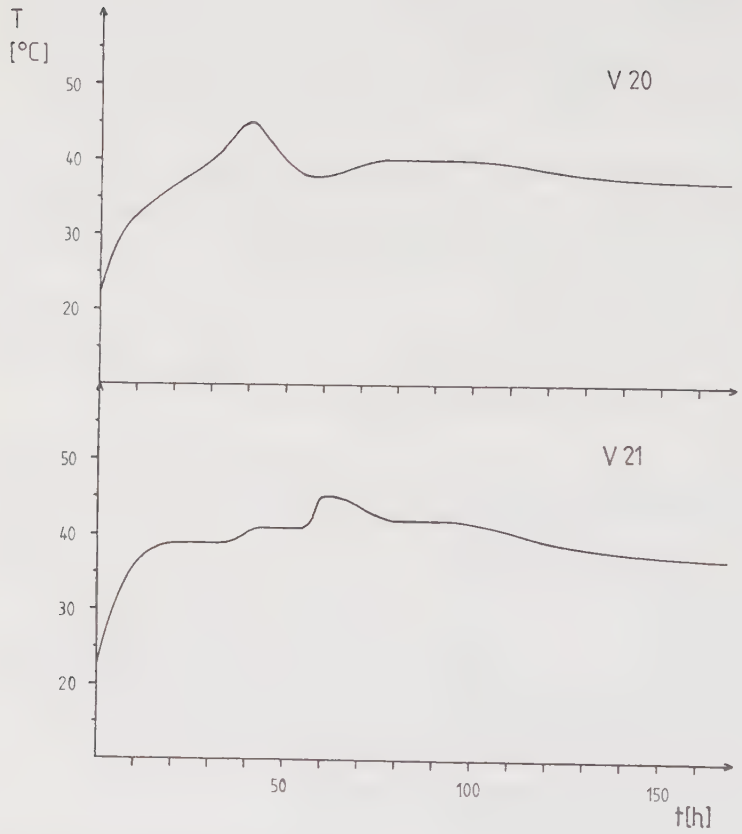


Abb. 11: Temperaturverlauf bei den aerob-thermophilen Abbauversuchen mit milchernährten Bakterienschlämmen

4.3.1. Temperaturverlauf

Beide Versuche hatten keinen Temperaturverlauf, der mit den Abbauversuchen von Klärschlamm vergleichbar gewesen wäre. Im ersten Abbauversuch (V 20) wurden zwei Temperaturmaxima erhalten, im zweiten Abbauversuch (V 21) war der Temperaturverlauf stufenförmig. Die Maximaltemperatur betrug bei beiden Versuchen 45 ^{o}C und

lag damit deutlich im thermophilen Bereich.

4.3.2. Bakterienschlamm

Die Elementaranalyse des milchernährten Bakterienschlamms wies keine Besonderheiten auf, jedoch lag der Glührückstand im zweiten Versuch erheblich über dem des ersten Versuchs.
Sehr starke Unterschiede ergaben sich für die abgebaute organische Trockensubstanz. Lag im ersten Versuch Δ TS_{org} mit 35,1 % im üblichen Rahmen, so lag dieser Wert im zweiten Versuch mit 21,8 % ungewöhnlich niedrig.

4.3.3. Huminsäure

Die Huminsäureausbeute betrug 6,6 und 5,8 % der abgebauten organischen Trockensubstanz. Damit nahmen die Abbauversuche mit milchernährtem Bakterienschlamm in der Huminsäureerzeugung eine Mittelstellung zwischen den Abbauversuchen mit zuckerernährtem Bakterienschlamm und den Abbauversuchen mit Klärschlamm ein.
Die Elementaranalysen der Huminsäuren wiesen die üblichen Werte auf. Wie auch schon beim Bakterienschlamm war der Wert für den Glührückstand auch bei der Huminsäure des zweiten Versuchs mit 18,8 % ungewöhnlich hoch.

4.3.4. Reaktionswärmen

Auch die Gesamtreaktionswärmen nahmen mit 47,1 und 80,4 kcal/l eine Mittelstellung zwischen den Versuchen mit zuckerernährtem Bakterienschlamm und Klärschlamm ein. Die spezifischen Reaktionswärmen waren mit 5,8 kcal/g Δ TS_{org} in beiden Versuchen praktisch

identisch.

4.3.5. Bewertung

Mit milchernährtem Bakterienschlamm ließ sich beim aerob-thermophilen Abbau ein deutlicher thermophiler Effekt erzielen. Auch deutete sich wieder die Proportionalität zwischen Huminsäureausbeute und Reaktionswärme an, konnte aber natürlich bei nur zwei Versuchen nicht dargestellt werden.
Wie die Temperaturkurven zeigten, brauchte der Bakterienschlamm einige Zeit, bis sich thermophile Mikroorganismen durchsetzen konnten. Außerdem schienen verschiedene Arten thermophiler Mikroorganismen miteinander zu konkurrieren (stufenförmiger Temperaturverlauf).
Verschiedene Abweichungen traten im zweiten Versuch auf. Neben dem hohen Glührückstand des Bakterienschlamms vor und nach dem Abbauversuch, der niedrigen Abbaurate an organischer Bakterienmasse, trat auch ein sehr hoher Glührückstand bei der isolierten Huminsäure auf. Ein Grund dafür kann nicht angegeben werden. Insofern müßen die Ergebnisse dieses Versuches mit Vorsicht in eine Gesamtschau mit einbezogen werden, wie auch schon beim Abbauversuch mit Tübinger Klärschlamm.
Ansonsten passen sich die Abbauversuche mit milchernährtem Bakterienschlamm zwischen die Versuche mit zuckerernährtem Bakterienschlamm und die Versuche mit Klärschlamm ein.

4.4. Zusammenfassende Diskussion der aerob-thermophilen Abbauversuche von Bakterienschlämmen

Mit den Versuchen zum aerob-thermophilen Abbau verschiedener Bakterienschlämme, konnten unter Laborbedingungen größere Mengen an Huminsäuren dargestellt werden, die zudem teilweise frei von Verunreinigungen waren, wie sie sonst beim Abbau von Klärschlämmen unvermeidlich sind.

Dabei konnten eine Reihe von Gesetzmäßigkeiten bei der Entstehung von Huminsäuren in biologischen Systemen gefunden werden.

Die Huminsäurekonzentration am Ende eines Abbauversuchs ist nur tendenziell abhängig von der während des Versuchs erreichten Maximaltemperatur. Der Zusammenhang ist dadurch gegeben, daß die Maximaltemperatur in gewisser Weise mit der Größe der Reaktionswärme verknüpft ist; wobei aber nicht unbedingt ein hohes Temperaturmaximum auch auf eine hohe Gesamtreaktionswärme hindeuten muß.

Die Konzentration der organischen Trockensubstanz zu Beginn eines Abbauversuches beeinflußt die Huminsäureausbeute nur insofern, als hohe Huminsäureausbeuten nur bei hohen Anfangskonzentrationen der Biomasse erhalten werden, aber nicht bei jeder hohen Anfangskonzentration automatisch auch hohe Huminsäurekonzentrationen gefunden werden können. Ähnliches gilt auch für die Abnahme der organischen Trockensubstanz während eines Versuchs. Es können hohe Abbauraten auftreten, ohne daß daraus große Reaktionswärmen, hohe Temperaturmaxima oder große Huminsäureausbeuten resultieren würden.

Die Versuche zeigten, daß in der Regel der Abbau von organischer Trockensubstanz unabhängig davon erfolgte, ob ein starker oder schwacher thermophiler Effekt zu beobachten war.

Sowohl für die Versuche mit Klärschlamm, als auch für die Versuche mit zucker- oder milchernährtem Bakterienschlamm wurde ein Zusammenhang zwischen der Reaktionswärme und der Huminsäureaus-

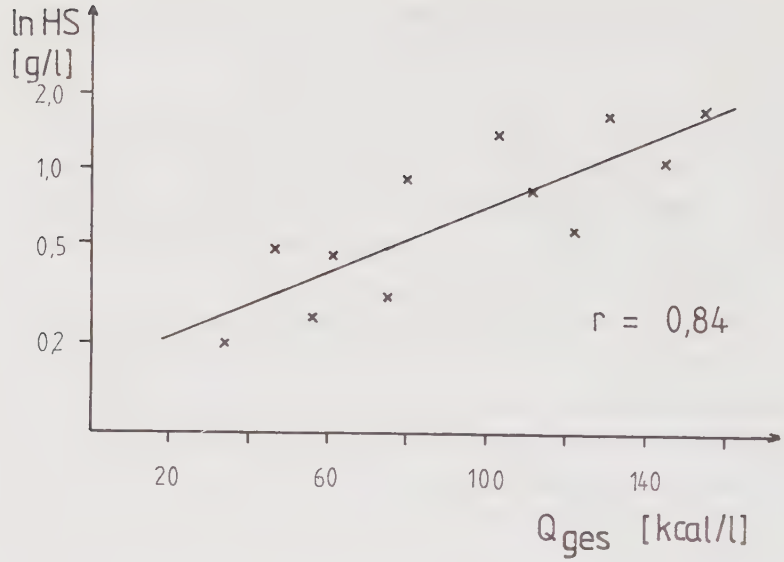


Abb. 12: Abhängigkeit der Huminsäureausbeute von der Gesamtreaktionswärme beim aerob-thermophilen Abbau aller Bakterien- und Klärschlämme

beute gefunden.

So ist die Huminsäureausbeute direkt proportional der spezifischen Reaktionswärme (der Wärmemenge pro Gramm abgebauter organischer Trockensubstanz), und außerdem steigt die Huminsäurekonzentration exponentiell mit der Zunahme der Gesamtreaktionswärme. Dies wurde besonders deutlich an den Versuchen mit zuckerernährtem Bakterienschlamm, wo sich bei praktisch unveränderten Schlammeigenschaften für diese Zusammenhänge sehr gute Korrelationen von r = 0,99 ergaben.

Stellt man die erreichten Huminsäurekonzentrationen den Reaktionswärmen in allen Abbauversuchen einander gegenüber, so fügen sich die Wertepaare aller Versuchsreihen zwanglos zueinander (s. Abb. 12 und 13). Folgende Zahlen wurden erhalten:

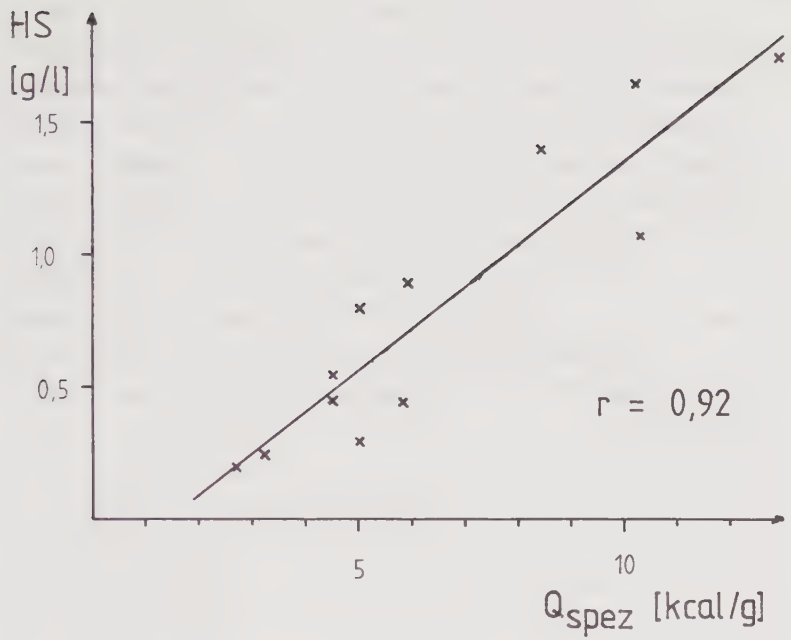


Abb. 13: Abhängigkeit der Huminsäureausbeute von der spezifischen Reaktionswärme beim aerob-thermophilen Abbau aller Bakterien- und Klärschlämme

$\ln HS = f(Q_{ges})$ $\quad r = 0,84$

$HS = f(Q_{spez})$ $\quad r = 0,92$

Diese aus jeweils 12 Wertepaaren gebildeten Beziehungen bestätigen eindrucksvoll eine allgemeingültige Gesetzmäßigkeit bei der Huminsäureentstehung in aerob-thermophilen Abbauprozessen:

> Die Höhe der Huminsäureausbeute ist direkt abhängig von der Größe der Reaktionswärme beim aerob-thermophilen Bakterienschlammabbau, unabhängig von der Zusammensetzung der Biomasse.

Der Abbau konzentrierter Bakterienmasse unter aeroben Bedingungen muß nicht mit wesentlicher Erwärmung verbunden sein, ist also nicht von der Anwesenheit thermophiler Mikroorganismen abhängig; vorausgesetzt, daß die thermophilen Mikroorganismen diejenigen sind, die die Erwärmung isolierter Systeme auf temperaturen oberhalb 40 - 45 °C bewirken. Vielmehr scheint es recht lange zu dauern, bis sich thermophile Mikroorganismen, bei sonst optimalen Grundvoraussetzungen (große Biomassenkonzentration, aerobe Bedingungen, Temperatur schon bei 37 °C durch den Energieeintrag des Rührers), so weit vermehrt haben, daß deutliche Erwärmung des Systems auftritt (Abbauversuche mit zuckerernährtem Bakterienschlamm V 17 und daraus angeimpfter Versuch V 18).

Die Abbauversuche mit Klärschlamm zeigten dagegen direkt nach Versuchsbeginn einen steilen Temperaturanstieg, so daß man annehmen muß, daß schon vorher im Klärschlamm thermophile Mikroorganismen in höherer Anzahl vorhanden gewesen sein müssen, die bei Temperaturanstieg sofort mit einer sprunghaft erhöhten Stoffwechseltätigkeit reagierten.

Wesentliche und sofortige Erwärmung beim aerob-thermophilen Abbauprozess tritt also nur auf, wenn schon thermophile Mikroorganismen in der Biozönose des Bakterienschlamms vorliegen. Da Huminsäure nur dann gebildet wird, wenn biologisch induzierte Erwärmung auftritt, sind also aller Wahrscheinlichkeit nach die thermophilen Mikroorganismen wesentlich an der Huminsäurebildung beteiligt, denn die Huminsäureausbeute ist ja direkt abhängig von der Wärmemenge beim aerob-thermophilen Abbau, und nicht vom Abbau organischer Biomasse.

Bei der aeroben Stabilisierung von nicht aufkonzentrierten Belebtschlämmen werden 30 - 50 % der organischen Trockensubstanz abgebaut (etwa 1 - 4 g/l TS_{org}). Bei einer Huminsäureausbeute von 20 - 30 % pro Gramm abgebauter organischer Trockensubstanz hätte man unter thermophilen Bedingungen dann Huminsäurekonzentrationen von 200 - 1.000 mg/l zu erwarten gehabt, tatsächlich werden aber

unter Normalbedingungen nur ca 10 - 40 mg/l gefunden (62, 63). Bei niedrigen Temperaturen (10 - 20 ^{o}C) ist die Stoffwechseltätigkeit der thermophilen Mikroorganismen sehr weit herabgesetzt, so daß auch keine bedeutende Huminsäurebildung mehr verzeichnet werden kann. Dies mag als ein weiterer Hinweis darauf dienen, daß die Huminsäurebildung in aeroben Bakterienschlammsystemen tatsächlich an die thermophilen Mikroorganismen gebunden ist.

Ob die Huminsäurebildung durch Freisetzung aus thermisch oder enzymatisch aufgebrochenen Zellmembranen geschieht, oder ob sie ein Stoffwechselprodukt der thermophilen Mikroorganismen sind, lässt sich durch die vorliegenden Untersuchungen nicht klären.

5. Isolierung von Huminsäuren

Bei der Gewinnung von Naturstoffen ist schon die Isolierung und Reinigung im Hinblick auf weitere Untersuchungen von besonderer Bedeutung. Neben einer möglichst quantitativen Ausbeute muß gewährleistet sein, daß das Naturstoffmolekül weder durch Kontaminationen, noch durch Veränderungen seiner Struktur, beeinflußt wird.
Huminsäuren werden sowohl aus Festkörpern (Boden-, Torf-, Kohle-, Sedimentproben) gewonnen, als auch aus wässrigen Lösungen, wie Meeres-, See-, Fluß- und Moorwasser, aber auch aus Klärschlämmen isoliert. So mußte für jeden Einzelfall eine eigene Methode gefunden werden, die den oben genannten Anforderungen bei der Isolierung von Naturstoffen möglichst weitgehend entspricht.

5.1. Isolierung aus Festkörpern

Bei der Isolierung von Huminsäuren aus Festkörpern stellt sich vor allem das Problem, daß Huminsäuren nur im alkalischen Milieu aus den Festkörpern gelöst werden können, schon im Neutralbereich sind keine nennenswerten Ausbeuten mehr zu verzeichnen. Die am häufigsten angewandte Methode erfolgt nach dem Fraktionierungs- und Reinigungsschema von Pierce/Felbeck (64) (s. Abb. 14), das auch von Schnitzer u. Khan (1) und anderen Autoren (65, 66) als Standardverfahren angesehen wird.
In neuerer Zeit häuften sich die kritischen Stimmen zu dieser Methode.
Ceccanti et al. (67) schließen hydrolytische Veränderungen am Huminsäure-Molekülgerüst bei drastischer Behandlung mit Säuren und Laugen nicht aus und empfehlen eine Extraktion mit 0,1 molarer Natriumpyrophosphat-Lösung bei pH 7 und anschließende Reinigung durch Ultrafiltration.
Stuermer u. Harvey (68) belegen mit ^{13}C-NMR-spektroskopischen

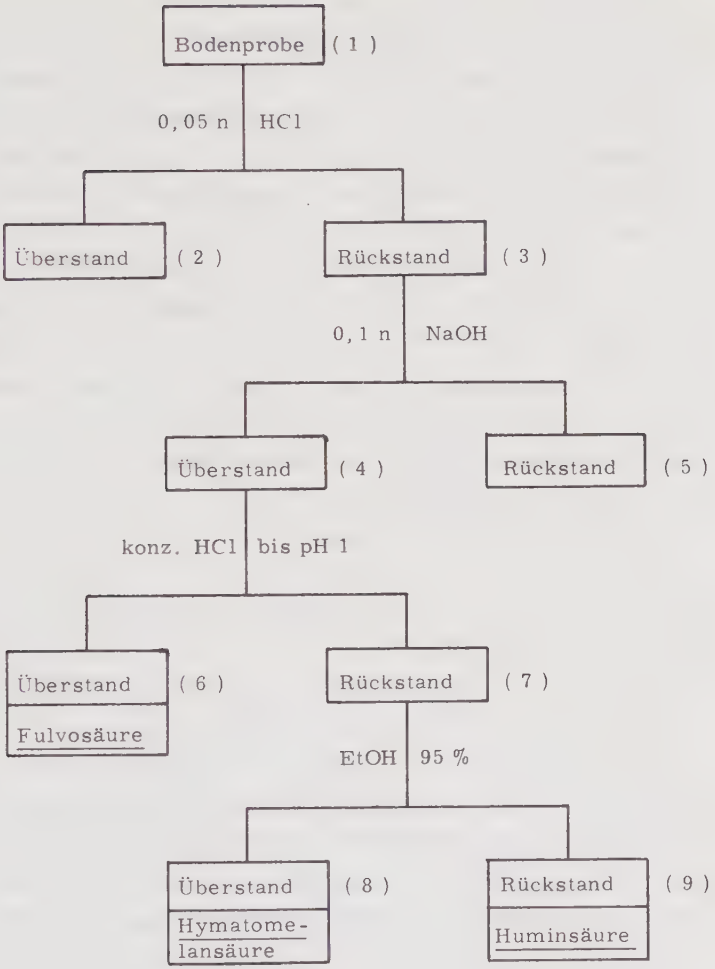


Abb. 14: Isolations- und Fraktionierungsschema von Huminsäuren nach Pierce/Felbeck

Untersuchungen, daß die Veränderungen am Huminsäuremolekül vor allem im Bereich aromatischer Strukturelemente (110 - 160 ppm) bei verstärktem Einsatz von Säuren und Laugen zur Isolation und Reini-

gung immer gravierender werden.

Khairy u. Ziechmann (69) zeigten schließlich, daß Hymatomelan- und Fulvosäuren offensichtlich Artefakte sind, die bei der Gewinnung von Huminsäuren nach dem Schema von Pierce/Felbeck erfolgen. Sie setzten schon nach dem Fraktionierungsschema gewonnene Huminsäure (Abb. 14, Nr. 9) erneut in das Schema bei Nr. 3 ein und erhielten wiederrum Hymatomelansäure, Fulvosäure und Huminsäure. Nach n-maliger Wiederholung dieses Vorgehens war dann die gesamte Huminsäure in Fulvosäure und Hymatomelansäure, sowie Rückstand umgewandelt.

Aus diesen exemplarisch erwähnten Untersuchungen geht in aller Deutlichkeit hervor, daß insbesondere für Strukturuntersuchungen am Huminsäuremolekül schon bei der Isolation die Anwendung von Säuren und Laugen völlig ungeeignet ist.

Es treten dabei folgende unerwünschte Effekte auf:

1. Bildung von Artefakten
2. Veränderung der Struktur des Huminsäuremoleküls, vor allem im aromatischen Bereich
3. Kontamination durch mitextrahierte anorganische und organische Substanzen
4. Hydrolytische Spaltung und Decarboxilierung

Auch die schonenderen Extraktionsverfahren mit wässrigen $Na_2P_4O_7$-, Na_3PO_4- und Na_2CO_3-Lösungen schließen die oben genannten Effekte nicht vollständig aus, und sind lediglich als Kompromiß zu verstehen, da eine das Huminsäuremolekül überhaupt nicht verändernde Extraktionsmethode aus den Festkörpern bislang nicht bekannt ist.

5.2. Isolierung aus wässrigen Lösungen

Etwas günstiger stellen sich die Möglichkeiten zur schonenden Isolierung von Huminsäuren aus wässrigen Lösungen dar. Vielfach ergeben sich aber aus den geringen Konzentrationen von weniger als ei-

nem Milligramm pro Liter neue Probleme. Daher wurden eine Reihe von Methoden vorgeschlagen und angewandt:

1. Adsorption der Huminsäuren auf grobporigen, nichtionischen Amberlite XAD Harzen (32).
   Diese Harze werden mit 0,1 n NaOH eluiert. Die erhaltene Lösung wir dann dem Fraktionierungsschema nach Pierce/Felbeck unterworfen.
2. Eine auf pH 2 mit HCl angesäuerte Wasserprobe wird über Amberlite XAD 2 Harz gegeben. Die adsorbierte Huminsäure wird mit einer auf pH 11,6 eingestellten ammoniakalischen Lösung eluiert und dann ebenfalls nach dem Fraktionierungsschema von Pierce/Felbeck weiterbehandelt (68).
3. Adsorption der Huminsäure auf saurem Al_2O_3. Elution mit einer Mischung aus 0,1 m NaOH mit 0,1 m $Na_4P_2O_7$. Nach Ansäuern der Elutionslösung auf pH 1 erfolgt Dialyse gegen destilliertes Wasser (70).

Bei den Methoden 1 und 2 wird nach einer Anreicherung der gelösten Huminsäuren auf XAD-Harzen praktisch wieder so vorgegangen, wie bei der Extraktion und Reinigung von Huminsäuren aus Festkörpern. Es werden also auch dieselben Fehlermöglichkeiten in Kauf genommen. Bei der Methode 2 wurde zusätzlich eine Erhöhung des Stickstoffgehalts der Huminsäure bei Eluierung mit NH_3-Lösung an Stelle von NaOH-Lösung festgestellt. Auch bei der Methode 3 wird teilweise auf das Schema von Pierce/Felbeck zurückgegriffen, und erst später eine schonende Dialyse zur Reinigung eingesetzt.

5.3. Schonende Isolierung von Huminsäuren aus Bakterienschlämmen

Nach den bisher dargestellten Methoden zur Isolierung von Huminsäuren konnte die Veränderung des nativen Huminsäuremoleküls nicht ausgeschlossen werden. Für die Strukturuntersuchungen von in bio-

logischen Systemen neu entstandenen Huminsäuren, wie in der vorliegenden Arbeit, ist aber eine schonende Isolierungsmethode unabdingbar. Es wurde daher die Ultrafiltrationstechnik angewandt, die diesen Anforderungen weitgehend gerecht wird (33, 35). Dieses Verfahren wird mittlerweile auch von anderen Autoren (67, 71, 72) erfolgreich zur Reinigung von Huminsäuren eingesetzt.

Bei der Ultrafiltration handelt es sich um eine beschleunigte Dialyse über Membranen unter Druck. Wie es sich gezeigt hat, sind kommerziell erhältliche Membranen aus aromatischem Polyamid (Terephthalsäure + Benzidin) üblicherweise mit Glycerin konditioniert, dessen Kondensationsprodukte auch bei vorschriftsmäßiger Anwendung der Membranen die Huminsäuren kontaminierten. Es wurden daher Polysulfonmembranen hergestellt [3], deren Ausschlußgrenzen gegen UM 2-Membranen (Ausschlußgrenze 1.000 dalton) und UM 10-Membranen (Ausschlußgrenze 10.000 dalton) der Fa. Amicon geeicht wurden. Diese Polysulfonmembranen waren gegenüber Huminsäurelösungen völlig inert und konnten keinerlei Kontamination verursachen. Gleichzeitig zeigten diese Membranen auch kaum Tendenzen, Huminsäuren an der Oberfläche zu adsorbieren.

Ein weiteres Problem bestand darin, die Rohhuminsäurelösungen aus den aerob-thermophil abgebauten Bakterienschlämmen zu gewinnen. Auf einen Einsatz von Chemikalien, wie Flockungshilfsmitteln, mußte zwangsläufig verzichtet werden, um die Huminsäuren nicht von vorneherein zu verunreinigen. Auch die Extraktion dieser äußerst schwer filtrierbaren Schlämme mit 0,1 n NaOH schied aus, wie an einem Beispiel gezeigt werden konnte.

Die ^{1}H-NMR-Spektren in Abb. 15 zeigen am Beispiel der Huminsäure des Abbauversuchs V 18 deutlich den Unterschied zwischen schonender Extraktion mit Wasser (Spektrum I) und der Extraktion mit 0,1 n NaOH (Spektrum II). Neben starken Veränderungen im Polyetherbereich (3,3 - 4,5 ppm) tritt bei alkalisch extrahierter Huminsäure bei

---

3) Ich danke Herrn Dr. W. Schumann für die Herstellung von Membranen verschiedener Ausschlußgrenzen

Abb. 15: ^{1}H-NMR-Spektren derselben Huminsäure bei unterschiedlicher Extraktionsmethode (400 MHz-Spektrometer, 500 scans, D_2O, gated-decoupling)

I Extraktion mit H_2O (pH 7,0)

II Extraktion mit 0,1 n NaOH

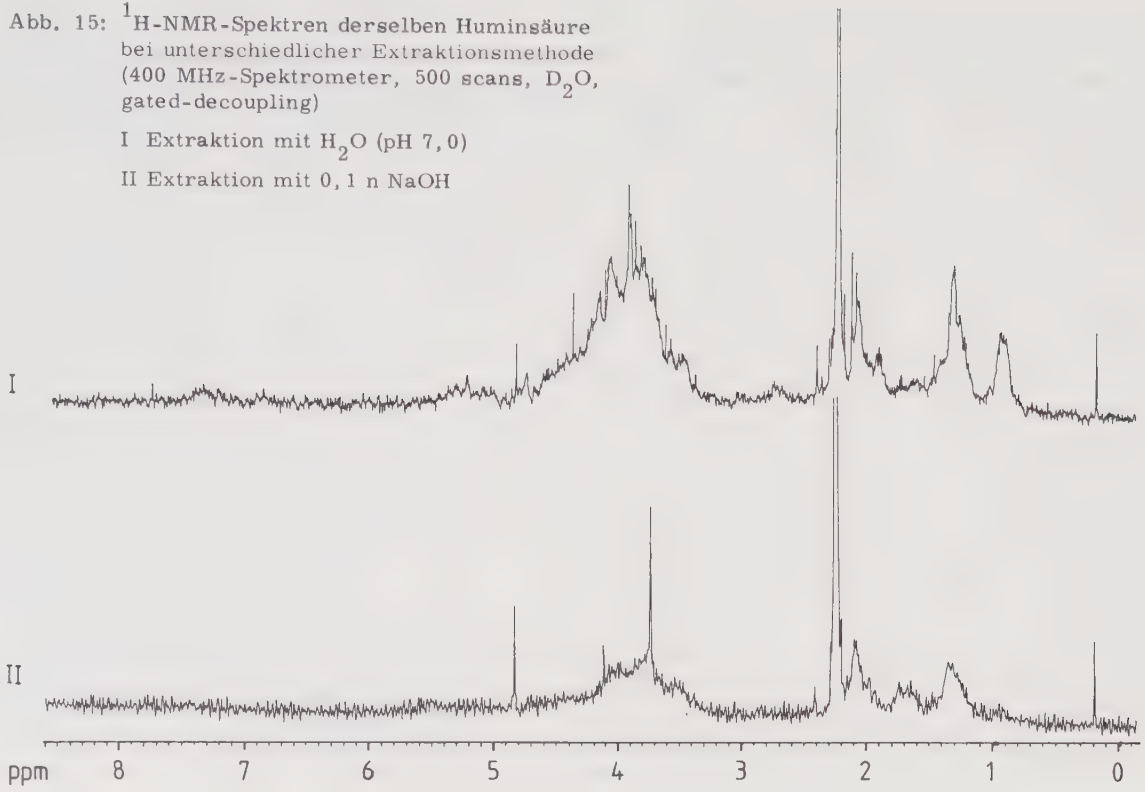
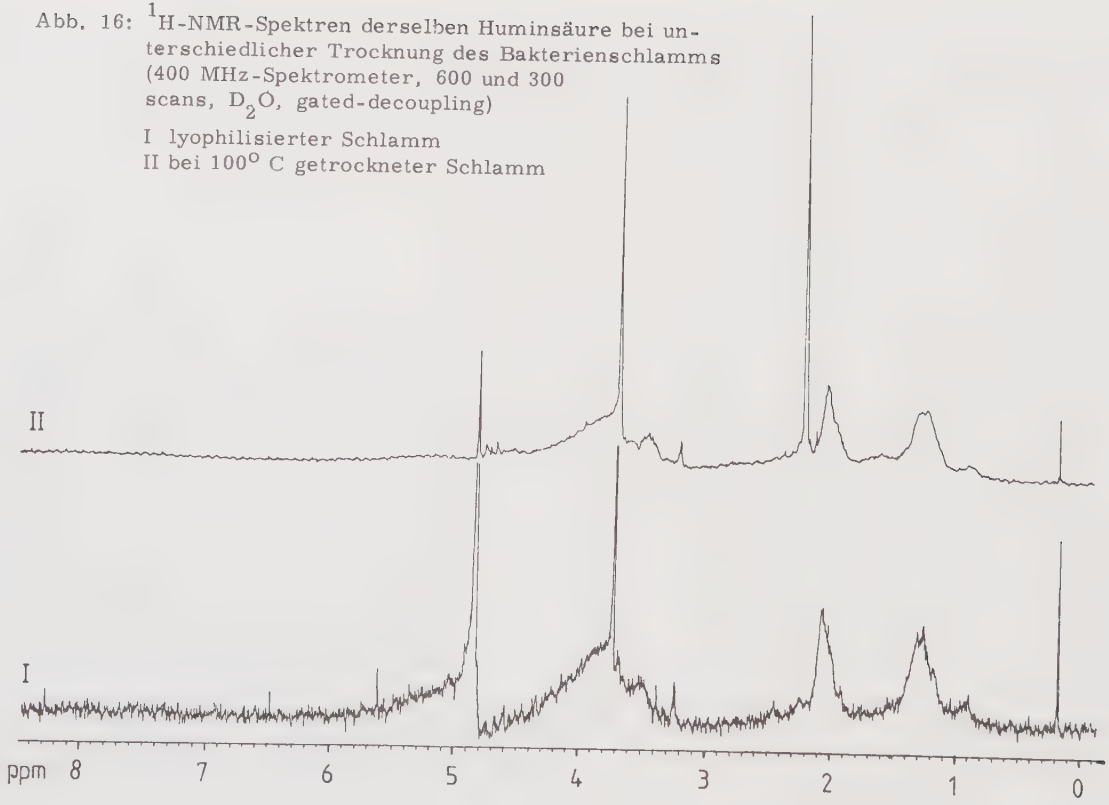


Abb. 16: ^{1}H-NMR-Spektren derselben Huminsäure bei unterschiedlicher Trocknung des Bakterienschlamms (400 MHz-Spektrometer, 600 und 300 scans, D_2O, gated-decoupling)

I lyophilisierter Schlamm
II bei 100° C getrockneter Schlamm



1,7 ppm eine zusätzliche Signalgruppe im aliphatischen Bereich auf.

Als eine praktikable Lösung, die Filtrierbarkeit zu verbessern, erwies es sich, den aerob-thermophil abgebauten Bakterienschlamm zu trocknen, und anschließend mit auf pH 7,0 eingestelltem destilliertem Wasser zu extrahieren. Dabei war es aber schon von einiger Bedeutung, wie der Schlamm getrocknet wurde. Es bot sich an,den Schlamm entweder bei 100 °C im Trockenschrank zu trocknen, oder ihn zu lyophilisieren.
Am Beispiel der Huminsäure des Abbauversuchs V 19 konnte an Hand der ^{1}H-NMR-Spektren (Abb. 16) gezeigt werden, daß sich die Huminsäure aus dem ofengetrocknetem Schlamm (24 h, 100 °C) (Spektrum II) von der aus lyophilisiertem Schlamm (Spektrum I) unterschied. Es waren leichte Veränderungen im Polyätherbereich (3,3 - 4,5 ppm) und eine zusätzliche singuläre Resonanz bei 2,2 ppm zubeobachten.

Bei der Ofentrocknung übernehmen die anorganischen Substanzen des Schlamms wahrscheinlich eine katalytische Funktion bei der beginnenden Umwandlung der Huminsäure zu Kerogen, die nach Peters et al. (13) schon nach einstündiger Behandlung bei 100 °C nachweisbar sein soll.
Damit blieb als Trocknungsmöglichkeit für den Schlamm nur die Lyophilisation, die die Huminsäuren nicht veränderte.
Somit stand eine Isolierungs- und Quantifizierungsmethode zur Verfügung, die bei allen Stufen der Isolation und Reinigung eine äußerst schonende Behandlung der Huminsäuren gewährleistete:
Der aerob-thermophil abgebaute Bakterienschlamm wurde lyophilisiert, das Lyophilisat mit auf pH 7,0 eingestelltem, destilliertem Wasser aufgeschlämmt und über grobporige Faltenfilter abfiltriert. Eine versuchsweise durchgeführte Nachextraktion des Rückstands mit 1 n NaOH-Lösung erbrachte keine Huminsäureausbeute, so daß angenommen werden konnte, daß die Huminsäure nach diesem Verfahren quantitativ vom Schlamm extrahiert wurde. Die Rohhuminsäurelösung wurde sofort über Bakterienfilter sterilfiltriert, um

eventuelle mikrobielle Einflüße auf die Huminsäuren auszuschließen. Anschließend wurde die Huminsäurelösung über Polysulfonmembranen der Ausschlußgrenze 1.000 dalton mit doppelt destilliertem Wasser ultrafiltriert und eingeengt, bis das Permeat farblos war und kein Chlorid mehr nachgewiesen werden konnte. Die ultrafiltrierte Huminsäurelösung wurde lyophilisiert und zur quantitativen Bestimmung die getrocknete Huminsäure ausgewogen.

6. Charakterisierung der Huminsäuren

Zur Charakterisierung der gewonnenen Huminsäuren wurden neben der Elementaranalyse spektroskopische Methoden, wie IR- und NMR-Messungen, herangezogen.
Andere spektroskopische Methoden schieden aus, da sie keine brauchbaren Resultate lieferten.

6.1. Elementaranalysen

In Tabelle 7 sind die Mittelwerte für die Elementarzusammensetzungen der Huminsäuren aus den einzelnen Versuchsreihen angegeben.

Huminsäure	C	H	N	S	O	Asche
	%	%	%	%	%	%
Klärschlamm	40,2	5,5	5,4	3,2	45,7	8,7
zuckerernährte Bakterienmasse	38,2	6,0	3,5	2,5	48,4	11,7
milchernährte Bakterienmasse	40,9	5,6	6,8	0,6	46,7	14,9

Tabelle 7: Elementaranalysen der Huminsäuren der einzelnen Versuchsreihen

Unterschiede sind im Wesentlichen nur beim Stickstoffgehalt der Huminsäuren erkennbar. Während der Stickstoffgehalt für Huminsäuren aus zuckerernährter Bakterienmasse relativ niedrig liegt, ist er bei Huminsäuren aus milchernährter Bakterienmasse etwas erhöht. Der Schwefelgehalt liegt bei den Huminsäuren aus milchernährtem Bakterienschlamm besonders niedrig.

6.2. Infrarotspektroskopie

Die Huminsäureproben wurden mit KBr verrieben und in einem IR-Spektrometer der Fa. Perkin-Elmer vermessen [4].
Die Spektren der Huminsäuren aus den unterschiedlichen Versuchsreihen wiesen nur geringfügige, aber charakteristische Unterschiede auf. Alle Spektren erwiesen sich den bekannten IR-Spektren von Boden-, Sediment- und Wasserhuminsäuren als weitgehend ähnlich (16, 25, 70, 73 - 76). Für die Banden der IR-Spektren (s. Abb. 17) sind in Tabelle 8 die wahrscheinlichsten Zuordnungen angegeben.
Gegenüber dem Spektrum der Huminsäure aus Klärschlamm (A) tritt bei dem Spektrum der Huminsäure aus zuckerernährter Bakterienmasse (B) bei 1720 cm^{-1} eine deutliche Schulter auf, während die Bande bei 1540 cm^{-1} zurückgeht. Die Bande bei 1400 cm^{-1} spaltet schwach in zwei Banden auf (1410 und 1380 cm^{-1}). Die schwache Bande bei 1310 cm^{-1} verschwindet ganz, während die Bande bei 1250 cm^{-1} stark hervortritt. Deutlicher wird auch die Bande bei 800 cm^{-1}.
Im Spektrum der Huminsäure aus milchernährter Bakterienmasse (C) reduziert sich die Bande bei 1540 cm^{-1} zu einer Schulter, die Bande bei 1400 cm^{-1} tritt deutlich verstärkt hervor, während die Bande bei 1250 cm^{-1} weit zurückgeht. Die Bande bei 800 cm^{-1} ist auch hier stärker ausgeprägt.

---

4) Ich danke Frl. Förstel für die Durchführung dieser Messungen

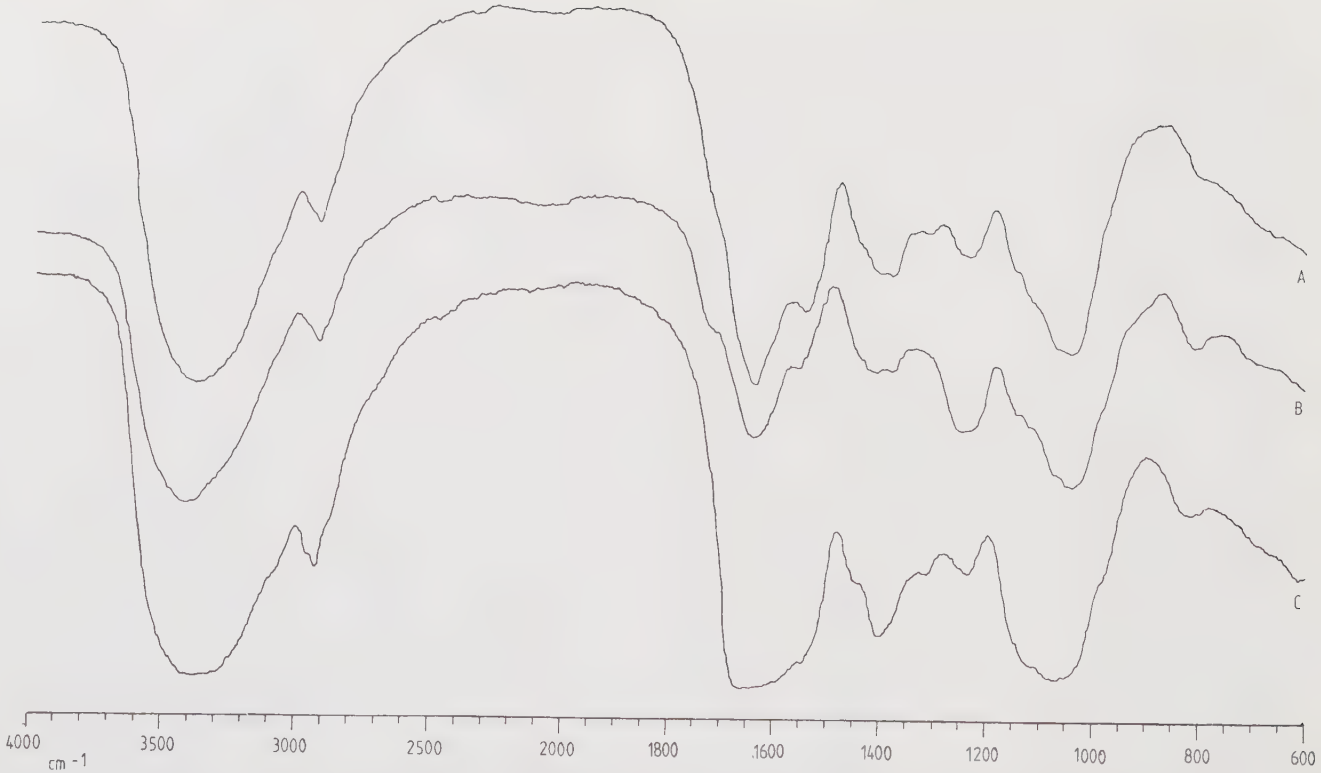


Abb. 17: IR-Spektren der Huminsäuren aus Klärschlamm (A), zucker- (B) und milchernährter (C) Bakterienmasse (IR-Spektrometer der Fa. Perkin Elmer, KBr-Pressling (300 mg KBr, 2 mg HS), Referenz KBr)

Bandenlage	mögliche Zuordnung
3400 cm^{-1}	OH- und CH-Streckschwingungen
2930 cm^{-1}	CH-Valenzschwingung
1820 - 1640 cm^{-1}	C=O-Schwingung
1540 cm^{-1}	aromatische C=C-Valenzschwingung
1400 cm^{-1}	Carboxylatschwingung
1240 cm^{-1}	C-O-Streckschwingung
1120 cm^{-1}	aliphatische C-O-C-Etherschwingung
1050 cm^{-1}	polysaccharidartige Gerüstschwingung
810 cm^{-1}	CH-out of plane Schwingung

Tabelle 8: Mögliche Zuordnung der Banden der Huminsäure-IR-Spektren aus Abb. 17

6.3. ^{1}H-NMR-Spektroskopie [5)]

Die Huminsäureproben wurden in D_2O gelöst, im Meßröhrchen drei Minuten mit Stickstoff begast und in einem 400 MHz NMR-Spektrometer WM 400 der Fa. Bruker vermessen.
Das HDO-Signal wurde nach dem "gated-decoupling-Verfahren" unterdrückt. Die angegebenen Verschiebungswerte wurden auf das Methylsignal der 2-(Trimethylsilyl)-tetradeuteropropionsäure bezogen.

Die ^{1}H-NMR-Spektren der verschiedenen Huminsäuren (s. Abb. 18) wiesen ein gleichartiges Grundmuster auf, das sich in vier Bereiche aufgliedern lässt. Innerhalb dieser Bereiche traten für die Huminsäuren aus den verschiedenen Versuchsreihen charakteristische Unterschiede auf.

---

5) Für die Durchführung der Messungen danke ich Herrn Bretthauer, für die Hilfe bei der Interpretation der Spektren danke ich Herrn Dr. K. Albert

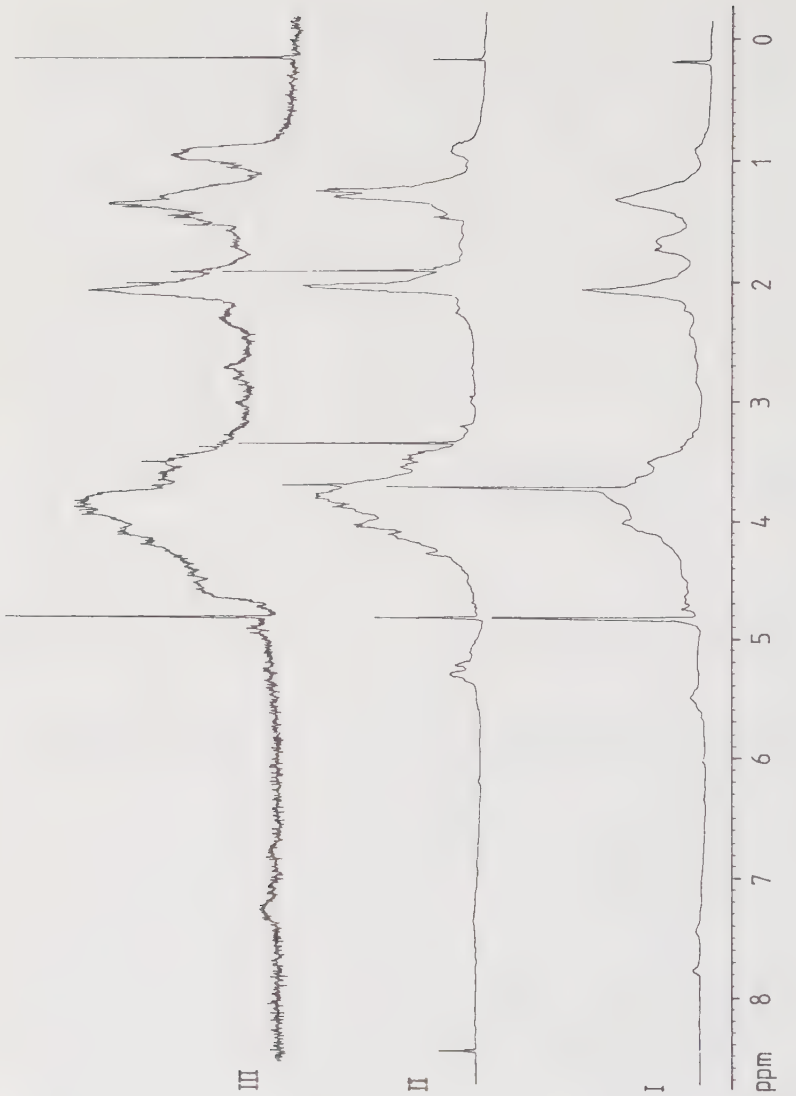


Abb. 18: ^{1}H-NMR-Spektren der Huminsäuren aus Klärschlamm (I, V 11), zucker- (II, V 13) und milchernährtem (III, V 21) Bakterienschlamm
400 MHz-Spektrometer, 1516 (I), 136 (II) und 428 (III) scans, D_2O, gated decoupling)

a) Aliphatischer Bereich (0,7 - 2,5 ppm)

Typisch waren für die Huminsäuren aller Versuchsreihen die Signalgruppen bei 0,7, 1,2 und 2,0 ppm, wobei das Methylsignal bei der Huminsäure aus milchernährtem Bakterienschlamm (Spektrum III) besonders ausgeprägt war. Bei der Huminsäure aus Klärschlamm (Spektrum I) trat bei 1,5 - 1,8 ppm eine zusätzliche Resonanz auf, die aber nicht immer zu beobachten war. Ebenso trat die singuläre Resonanz bei 1,9 ppm im Spektrum der Huminsäure aus zuckerernährtem Bakterienschlamm (II) nur vereinzelt auf.

b) Polyetherbereich (3,0 - 4,7 ppm)

Dieser Verschiebungsbereich zeigte die charakteristischsten Unterschiede zwischen den einzelnen Huminsäuretypen.

Bei der Huminsäure aus Klärschlamm (I) trat ein auf einen unstrukturierten Resonanzberg aufgesetztes singuläres Signal bei 3,6 ppm auf. Dieser Resonanzberg war bei den Spektren der Huminsäuren aus milchernährtem Bakterienschlamm (III) etwas strukturierter und wies bei 4,5 ppm eine sonst nicht auftretende Schulter auf.

Am besten strukturiert zeigte sich der Polyetherbereich bei den Spektren der Huminsäuren aus zuckerernährtem Bakterienschlamm (II); hier konnte vereinzelt eine singuläre Resonanz bei 3,3 ppm beobachtet werden.

c) Acetalbereich (5,0 - 5,7 ppm)

Bei den Spektren aller Huminsäuretypen sind kleine wenig strukturierte Signale bei 5,3 bis 5,5 ppm zu erkennen.

d) Aromatischer Bereich (6,8 - 8,5 ppm)

Am seltensten bei den Spektren der Huminsäuren aus zuckerernährtem Bakterienschlamm (II), und bei den Spektren der anderen Huminsäuretypen auch nicht regelmäßig, traten ein oder zwei schwache und unstrukturierte Signale bei 6,8, 7,4 und 7,8 ppm auf.

7. Untersuchungen zur Strukturaufklärung

Zur Aufklärung der Struktur der Huminsäuren wurde bisher eine Vielzahl von Methoden eingesetzt, die sich in drei Gruppen einteilen lassen:

1. Thermische Zersetzung - Pyrolyse

Neben der Thermogravimetrie (10) und der Differentialthermoanalyse (10, 73) wurde vor allem die Pyrolyse bei Temperaturen von 600 - 1.000 ^{o}C angewandt (13). Die Pyrolyse wurde meistens in Kombination mit chromatographischen Verfahren und/oder mit der Massenspektrometrie benutzt, um die einzelnen Reaktionsprodukte auftrennen und identifizieren zu können. Pyrolyse wurde kombiniert mit Dünnschicht- (77) und Gaschromatographie (78), mit Massenspektrometrie (79 - 82) und der datenbankunterstützten Methode GC-MS (83 - 85).

Die Nachteile dieser Verfahren bei völlig unbekannter Struktur liegen auf der Hand. Es lässt sich nicht verfolgen, wie die Huminsäure fragmentiert wird und wie diese Fragmente weiter reagieren und stabile Verbindungen bilden.

Aus dem bei diesen Untersuchungen erhaltenen hohen Anteil an verschieden substituierten aromatischen Carbonsäuren wurde gefolgert, daß die Huminsäurestruktur überwiegend aus aromatischen Anteilen gebildet wird.

2. Chemische Verfahren

Hier wurden bevorzugt hydrolytische Methoden angewandt, da ohnehin nur im wässrigen Milieu gearbeitet werden kann. Es wurden folgende Reagentien zur hydrolytischen Spaltung des Huminsäuremoleküls eingesetzt: Kupferoxid/Natronlauge (75), Salzsäure (49, 86 - 90), Perchlorsäure (89), Salpetersäure (65, 89, 91), Schwefelsäure (89), Kalilauge (92) und Natriumhydroxid/Bariumhydroxid (75, 93, 94).

Bei allen Methoden traten ähnliche Probleme auf. Bei zu drastischer Hydrolyse ließen sich als Reaktionsprodukte lediglich CO_2, H_2O, Oxalsäure und Essigsäure nachweisen. Andererseits wurde bei vorsichtigerer Hydrolyse nicht das gesamte Huminsäuremolekül erfasst; es blieben immer unlösliche Rückstände, bzw. Anteile, die häufig nach wie vor Huminsäurecharakter aufwiesen.

Wegen des geringen Erfolgs bei der Strukturaufklärung durch Hydrolyse, was schon von der Vielzahl der eingesetzten Methoden unterstrichen wird, wurde auch versucht durch Oxidation und Reduktion brauchbare Resultate zu erzielen. Weder durch die Oxidation mit Kaliumpermanganat (11, 45, 75, 95 - 98) noch durch die Ozonisierung (56, 57) gelang es, mehr als nur Hinweise auf die Struktur der Huminsäure zu erhalten, genauso wie weder die Reduktion mit Natrium (9), die Reduktion mit Natriumamalgam oder Natrium in flüssigem Ammoniak (99), noch die Zinkstaub-Destillation (92) erfolgreich waren.

Allen chemischen Verfahren gemeinsam ist, daß als Spaltprodukte ebenfalls eine große Anzahl aromatischer Verbindungen erhalten wurden, die im Allgemeinen als Hinweis auf einen hohen Aromatenanteil an den Strukturelementen im Molekülgerüst der Huminsäure gewertet wurden.

3. Spektroskopische Verfahren

Je mehr in der organischen Chemie das Werkzeug der Spektroskopie in der Analytik und Strukturaufklärung an Bedeutung gewann, desto mehr wurden diese Verfahren auch bei der Strukturaufklärung der Huminsäuren eingesetzt. Als wichtigste Methoden sind hier die Chemoluminiszene (100, 101), die Fluoreszenzspektroskopie (66, 102, 103), die UV/VIS-Spektroskopie (104), die Elektronenspinresonanzspektroskopie (73, 88, 101, 105, 106), die Infrarotspektroskopie (4, 16, 25, 73) und die Kernresonanzspektroskopie (Literaturhinweise s. Kap. II/7.6.) zu nennen. Während sich die meisten Methoden nur zur Charakterisierung der Huminsäuren eignen, sind in

neuerer Zeit vor allem durch die Kernresonanzspektroskopie bedeutende Einblicke in das Strukturgerüst der Huminsäuren gewonnen worden.

In der vorliegenden Untersuchung sollte zuerst noch einmal überprüft werden, ob die isolierten Huminsäuren überhaupt eine einheitliche Substanz darstellen (frühere Untersuchungen dazu hatten auf Grund der geringen Substanzmengen keine zuverlässige Aussage ermöglicht). Dann sollte die Möglichkeit untersucht werden, die in der Struktur der Huminsäuren vermuteten Etherbindungen zu spalten.
Der Schwerpunkt galt aber nach wie vor den kernresonanzspektrometrischen Untersuchungen an hochauflösenden Geräten.

7.1. Extraktion mit THF/HCl

Eine Huminsäureprobe wurde mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln am Soxhlet für jeweils 24 Stunden extrahiert. Dabei erwies sich die Mischung von THF mit wenigen Tropfen HCl als am effektivsten. Von der eingesetzten Huminsäure wurde dabei 2,9% des Gewichts entfernt.
Die Huminsäure wies im IR-Spektrum (Abb. 19) nach der Extraktion (Spektrum I) gegenüber der unbehandelten Huminsäure (Spektrum II) keine wesentlichen Veränderungen auf (Rückgang der Schulter bei 1740 cm^{-1} für die Carbonylschwingungen, Rückgang der Carboxylatschwingung bei 1550 cm^{-1} und Zunahme der CH-Valenzschwingung bei 2950 cm^{-1}).
Die THF-Lösung wurde vorsichtig abgedampft; es blieb ein gelblicher, zäher Rückstand, der im IR-Spektrum (Abb. 20) eindeutig als Phtalsäuredialkylester identifiziert wurde.

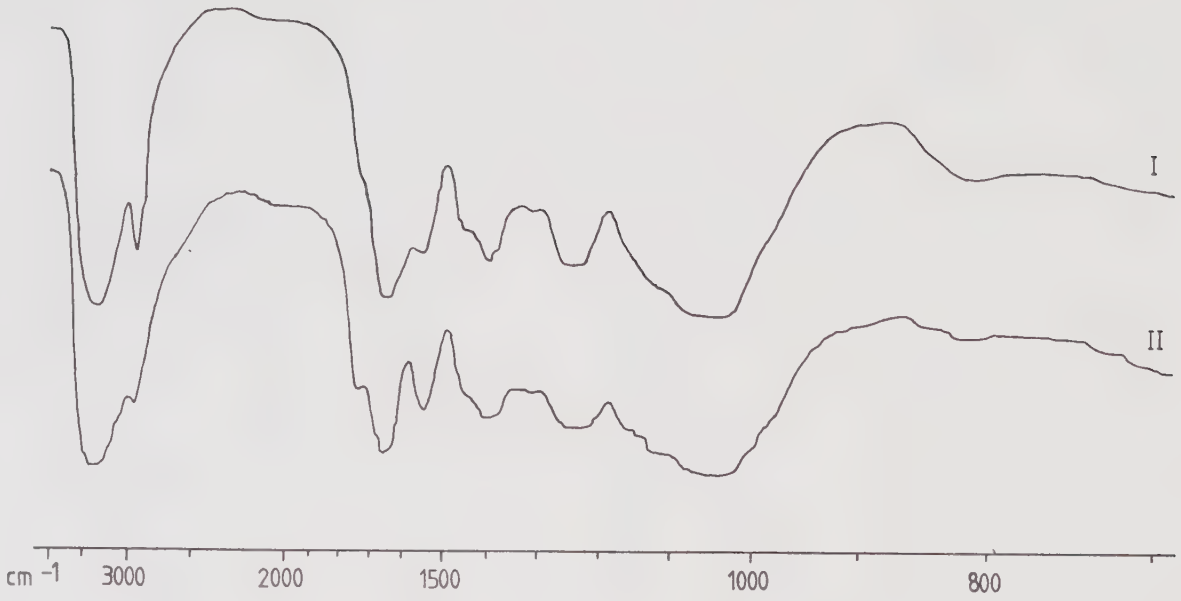


Abb. 19: IR-Spektrum einer Huminsäure - mit THF/HCl extrahiert (I) und unbehandelt (II)
(IR-Spektrometer der Fa. Perkin-Elmer, KBr-Pressling mit 2 mg HS in 300 mg KBr)

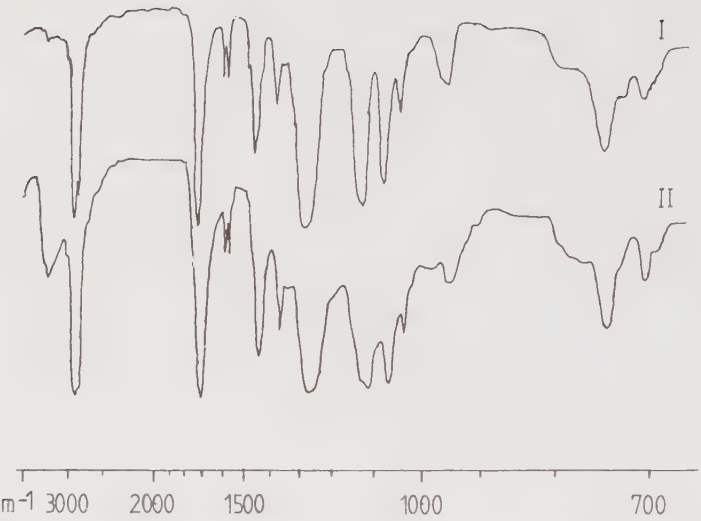


Abb. 20: IR-Spektrum des THF/HCl-Extrakts einer Huminsäure (II) und von Phtalsäuredioctylester (I)
IR-Spektrometer der Fa. Perkin-Elmer, Film auf NaCl-Scheibe, Referenz Luft

7.2. Hydrolyse mit 6 n HCl

Eine eingewogene Huminsäureprobe wurde mit 6 n HCl drei Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurde mit NaOH neutralisiert. Unlösliche Rückstände wurden abgetrennt, das Hydrolysat ultrafiltriert, um die Lösung zu entsalzen. Der Ultrafiltrationsrückstand wurde eingeengt und lyophilisiert.

Von der eingewogenen Menge an Huminsäure wurden 80,7 % als Lyophilisat zurückerhalten, 8,3 % waren unlöslicher Reaktionsrückstand und 11 % wurden von der Ultrafiltrationsmembran nicht zurückerhalten oder waren Verlust.

Das Huminsäurehydrolysat wurde gelchromatographisch untersucht.

7.3. Gelchromatographie

Es gab bislang verschiedene Versuche die Huminsäuren in unterschiedliche Fraktionen aufzutrennen. Dazu dienten vor allem Verfahren wie die Gradienten-Elution von XAD-Harzen (107, 108) und die Gelchromatographie (5, 16, 70, 103, 109 - 114). Ein wesentlicher Nachteil der Gelchromatographie bestand darin, daß regelmäßig Anteile der Huminsäuren irreversibel auf dem Gel gebunden wurden, andere Anteile ihre Struktur veränderten (bestimmte Fraktionen erfuhren eine Farbvertiefung); d.h., es bestand eine Wechselwirkung zwischen Gel und Huminsäure, die über das reine Sortieren nach Teilchengröße hinausging. Abhilfe schaffte die CPG-Chromatographie (CPG = controlled pore glas), mit Porendurchmessern von 150 - 200 Å. Hier wurde keine Wechselwirkung zwischen Glaskörpern und Huminsäure festgestellt, außer dem Sortieren nach Teilchengröße (115, 116).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Gelchromatographie zur Überprüfung auf die Einheitlichkeit der Huminsäuren eingesetzt.

Eine Reihe verschieden behandelter Huminsäureproben wurde über eine Säule mit Sephadex G 25 gelchromatographiert. Dabei wurden Proben von 20 mg Huminsäure in 2 ml Wasser auf die Säule gegeben. Die Huminsäureproben wurden mit doppelt destilliertem Wasser, das auf pH 7,0 eingestellt war, eluiert.

Es wurden drei verschiedene Proben eingesetzt:

a) unbehandelte Huminsäure
b) mit THF/HCl extrahierte Huminsäure (s. 7.1.)
c) mit 6 n HCl hydrolisierte Huminsäure (s. 7.2.)

Alle drei eingesetzten Huminsäureproben lieferten bei mehrfach wiederholten Ansätzen im wesentlichen gleiche Chromatogramme (s. Abb. 21). Von den aufgegebenen 20 mg Huminsäure wurden im Eluat zwischen 13 und 16 mg wiedergefunden, d.h., es blieben 20 - 35% der eingesetzten Huminsäure auf der Säule zurück und konnten nach

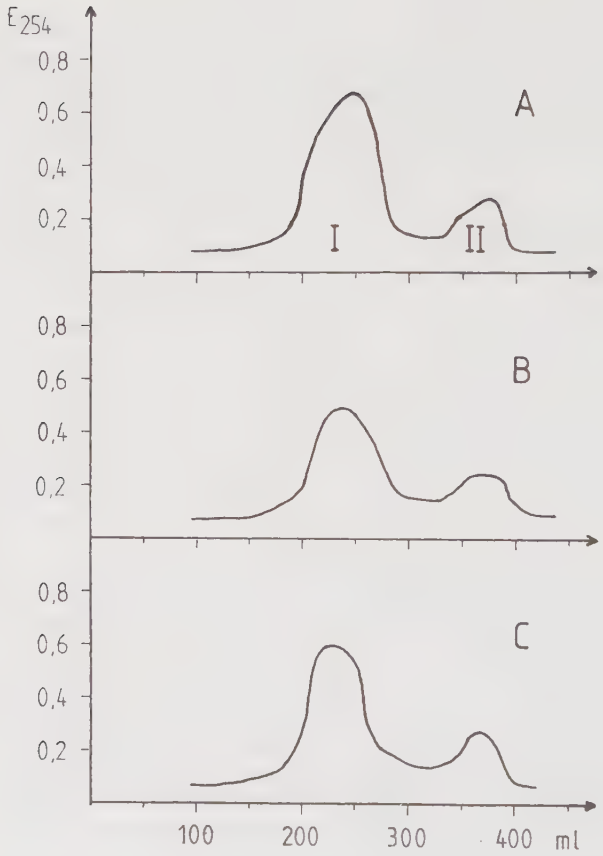


Abb. 21: Gelchromatogramme (Sephadex G 25) von unbehandelter Huminsäure (A), THF/HCl extrahierter Huminsäure (B) und HCl-hydrolisierter Huminsäure (C)

mehreren Versuchen als dunkelbrauner Ring am Säulenanfang beobachtet werden. Die Einzelfraktionen von ca. 10 ml wurden zu zwei Hauptfraktionen I und II (s. Abb. 21, A) vereinigt.

Fraktion I war von gelblich-brauner Farbe und wies bei allen drei

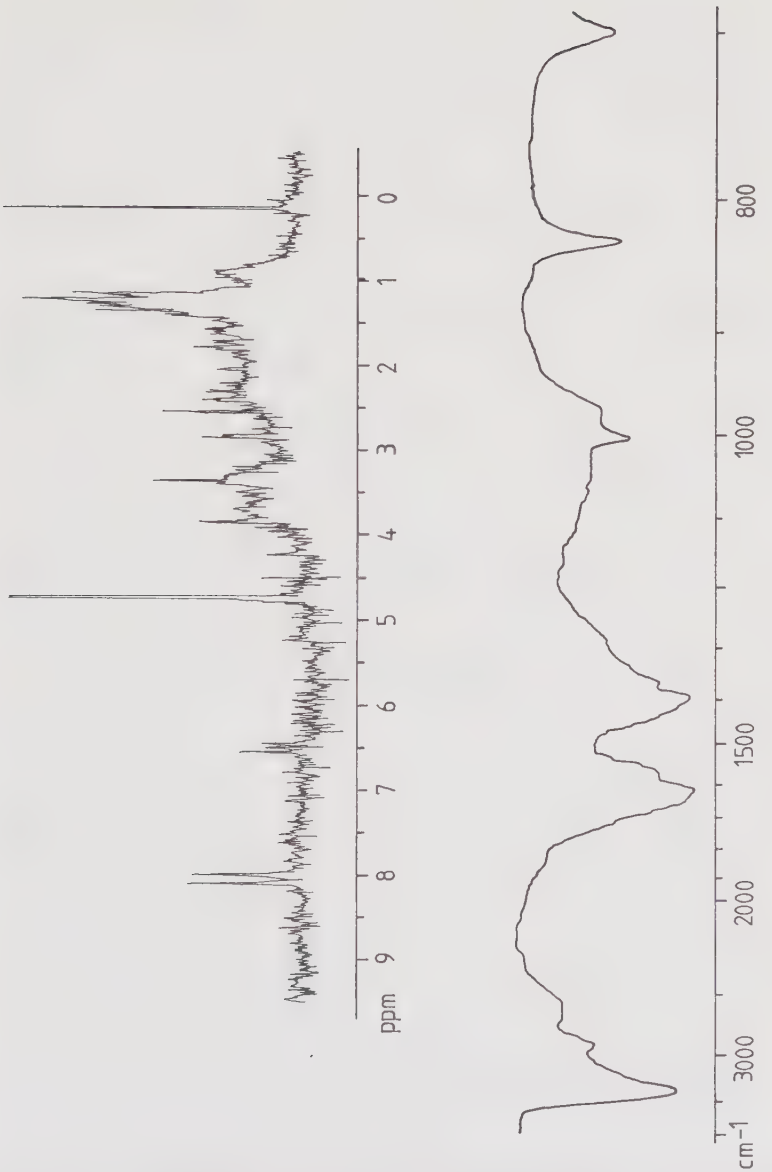


Abb. 22: ^{1}H-NMR-Spektrum (oben: 90 MHz-Spektrometer, 8 000 scans, D_2O, gated-decoupling) und IR-Spektrum (unten: Perkin-Elmer, KBr-Pressling mit 2 mg HS in 300 mg KBr, Referenz KBr) der Fraktion II der gelchromatographierten Huminsäure

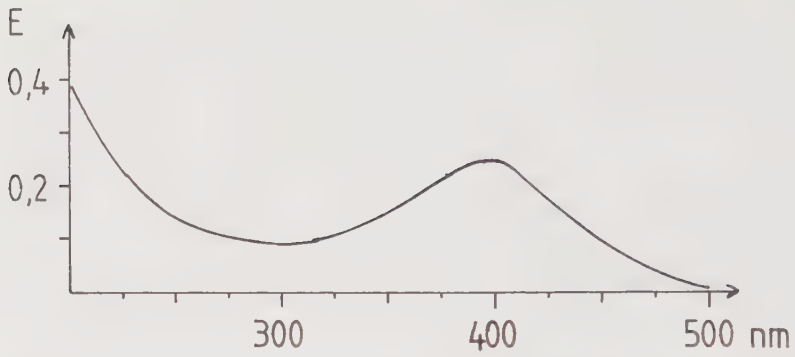


Abb. 23: UV-Spektrum der Fraktion II der gelchromatographierten Huminsäure

Huminsäureproben mit der eingesetzten unbehandelten Huminsäure praktisch identische IR-Spektren auf. Also wird der größte Teil der Huminsäure durch Extraktion mit THF/HCl, Hydrolyse mit 6 n HCl und durch Gelchromatographie weder verändert noch fraktioniert. Die niedermolekularere Fraktion II (0,5 - 1,0 mg Substanz) war von gelblich-grüner Farbe und wurde spektroskopisch charakterisiert (UV, IR, ^{1}H-NMR).

Diese niedermolekularere Substanz war also weder durch Extraktion mit THF/HCl, noch durch HCl-Hydrolyse von der Huminsäure abtrennbar und wies bis auf die physikalischen Eigenschaften (nur in Wasser löslich, kein Schmelzpunkt) erheblich andere Charakteristika als normale Huminsäure auf. Auffällig war das UV-Spektrum (Abb. 23) mit einem schwachen Maximum bei 400 nm, was der gelb-grünen Farbe entsprach, während normale Huminsäure kein Maximum im UV-Spektrum aufweist (62). Auch das IR-Spektrum (Abb. 22) unterschied sich sehr stark von den Spektren normaler Huminsäuren. Es fehlten Banden bei 1250 und 1050 - 1150 cm^{-1}, zusätzlich oder erheblich verstärkt traten Banden bei 2600, 1000 und 820 cm^{-1} auf. Im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 22) fehlte im aliphatischen Bereich die

typischen Resonanzen um 2,0 ppm, dafür traten Signale bei 2,5 und 2,8 ppm in einem Bereich auf, in dem bei Huminsäuren keine Resonanzen auftreten. Atypisch waren auch die Signale bei 6,5 und 8,0 ppm, wobei die letztere Signalgruppe für einen p-substituierten Aromaten sprach.
Da die Substanz der Fraktion II nur etwa 2 - 3 Gew.-% der Huminsäure ausmachte wurde sie nicht näher identifiziert.

Insgesamt scheint die Gelchromatographie für Untersuchungen an den hier behandelten Huminsäuren weniger geeignet zu sein, da allein schon 20 - 35% der eingesetzten Substanzmenge auf der Säule verbleiben, und keine Aussagen darüber gemacht werden können, welcher Art, außer dem Ausschlußprinzip, die Wechselwirkungen zwischen Gel und Huminsäure sind. Auch zur Molekulargewichtsbestimmung ist hier die Gelchromatographie nicht geeignet, da eine Eichung in Ermanglung einer geeigneten Vergleichssubstanz nicht möglich ist.

7.4. Reaktionen mit Iodwasserstoffsäure

Auf Grund der in der Huminsäurestruktur vermuteten Dominanz von Etherbindungen (s. auch Kap. 7.6.) sollte versucht werden, gezielt diese Bindung zu spalten, um so einerseits niedermolekulare Bruchstücke zu erhalten und andererseits die Existenz der Etherbindung zu beweisen.
Zur Etherspaltung bieten sich neben den Lewissäuren - wie den Bor- und Aluminiumtrihalogeniden -, tert. Butyl-Lithium hauptsächlich die Bromwasserstoff- und die Iodwasserstoffsäure an (117).
Der Mechanismus der Etherspaltung stellt sich folgendermaßen dar: im ersten Reaktionsschritt wird allgemein ein Oxonium-Ion gebildet

$$R_1 - O - R_2 \xrightarrow{H^{\oplus}} R_1 - \overset{\oplus}{\underset{H}{O}} - R_2 \qquad (1)$$

Das Oxonium-Ion reagiert je nach Reaktionsbedingungen und den Sub-

stituenten R_1 und R_2 nach S_{N1} oder S_{N2} ab, z.B.:

$$R_1 - \overset{\oplus}{O}H - R_2 \xrightarrow{X^{\ominus}} R_1X + R_2OH \quad (2)$$

Diese Reaktion verläuft aber im allgemeinen nicht glatt. Einerseits muß selbst bei hohen Reaktionstemperaturen mit einer nicht quantitativen Ausbeute an gespaltenem Ether gerechnet werden, andererseits sind Olefinbildung, Isomerisierung und erneute Etherbildung regelmäßig auftretende Nebenreaktionen. Weitere unerwünschte Nebenreaktionen sind zu erwarten, wenn die Substituenten R_1 und R_2 ihrerseits funktionelle Gruppen tragen.

Da Huminsäuren lediglich wasserlöslich sind, blieben als einzige sinnvoll einzusetzenden Etherspaltungsagentien die Bromwasserstoff- und die Iodwasserstoffsäure. Reaktionen mit HBr blieben wirkungslos, bzw. die Wirkung war nicht anders als bei einer HCl-Hydrolyse.

Es wurden mehere Versuchsreihen zur Reaktion mit Iodwasserstoffsäure unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen und Aufarbeitungsverfahren durchgeführt.

1. 100 ml einer 1%-igen Huminsäurelösung wurden mit verschiedenen HI-Konzentrationen (2 - 5%) für 2 - 24 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 1 n NaOH neutralisiert und vom Unlöslichem abfiltriert. Es wurde versucht das Reaktionsgemisch durch Ultrafiltration weiter zu behandeln. Dies erwies sich als ungangbarer Weg, da die Ultrafiltrationsmembran verstopfte und außerdem die Reaktionslösung nach und nach ausflockte. Der Niederschlag erwies sich ebenso wie der Filtrationsrückstand als unlöslich in organischen Lösungsmitteln, Säuren und Laugen. Damit konnte auch nicht festgestellt werden, ob eine Spaltung der Huminsäure in niedermolekularere Bruchstücke stattgefunden hatte.
2. Zunächst wurde wie unter 1. verfahren. Nach der Neutralisation

wurden sowohl der Reaktionsrückstand, als auch die flüssige Phase mit organischen Lösungsmitteln verschiedener Polarität extrahiert. Dabei zeigte es sich, daß die Reaktionslösung sehr viel freies Iod enthielt. Die organischen Phasen wurden mit Natriumthiosulfat reduziert und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Einrotieren wurden geringe Mengen dunkel gefärbter, öliger und wachsartiger Substanzen gefunden.
Der unlösliche Reaktionsrückstand betrug bis zu 50 % der eingesetzten Huminsäure und durch die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln ließen sich lediglich 1 - 5 % verglichen mit dem Huminsäuregewicht erhalten.

3. Die HI-saure Huminsäurelösung wurde mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln überschichtet und dieses Zweiphasensystem bis zu 8 Stunden unter Rückfluß gekocht. Die abgetrennte organische Phase wurde mit Natriumhydrogencarbonat entsäuert, die während der Reaktion freigesetzte Iodmenge mit Natriumthiosulfat reduziert und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Einrotieren ergaben sich nur geringfügig bessere Ausbeuten als bei dem unter 2. beschriebenen Verfahren. Dies änderte sich auch nicht, wenn die wässrige Phase auf die wenigen Milliliter der 57 %-igen Iodwasserstoffsäure beschränkt wurde.

4. Einer 1 %-igen Huminsäuresuspension in Methanol wurden 5 ml 57 %-ige Iodwasserstoffsäure zugesetzt und unter Rückfluß gekocht. Die Huminsäure schien sich nach der Iodwasserstoffsäurezugabe zu lösen, um dann alsbald als teerartiger Niederschlag wieder auszufallen. Gleichzeitig färbte sich die Reaktionsmischung durch oxidiertes Iodid intensiv rot.
Die filtrierte Reaktionsmischung wurde zur Trockne einrotiert und der Rückstand mit organischen Lösungsungsmitteln extrahiert, die wie oben beschrieben mit Natriumhydrogencarbonat, Natriumthiosulfat und Natriumsulfat behandelt wurden. Auch hier wurden nur geringe Ausbeuten erhalten.

Allen Verfahren war gemeinsam, daß die bis zu 50 % betragenden Reaktionsrückstände vollständig unlöslich in organischen Lösungsmitteln, Säuren und Basen waren.
Die in der wässrigen Phase gelösten Substanzen entzogen sich weiteren Untersuchungen durch den hohen Salzgehalt und/oder den Iodgehalt der Lösungen und durch das baldige Ausflocken.
Die Gewichte der mit organischen Lösungsmitteln extrahierten Substanzen betrugen 1 bis 5 % der eingesetzten Huminsäure. Es wurde versucht, die erhaltenen Substanzgemische auf Kieselgel-Säulen zu trennen. Jedoch wurde das meiste der Substanzen irreversibel auf der Säule adsorbiert (selbst bei Elution mit Lösungsmitteln quer durch die eluotrope Reihe bis hin zur Essigsäure). Gaschromatographische Methoden schieden von vorneherein aus, da die Siedepunkte der erhaltenen Substanzgemische zu hoch lagen oder schon vorher Zersetzung eintrat. Zudem veränderten sich die Substanzgemische schon nach wenigen Tagen; die Färbung wurde dunkler, die Substanzen wurden unlöslich.
So blieben lediglich spektroskopische Verfahren zur Charakterisierung dieser Substanzgemische, die das einzige greifbare Produkt der Reaktionen mit Iodwasserstoffsäure darstellten.

7.4.1. Massenspektroskopie [6]

Massenspektroskopische Untersuchungen der abgetrennten Substanzgemische ergaben lediglich die Nachweise für die bekannten Verunreinigungen der Huminsäuren durch Abwasserinhaltsstoffe. So wurden identifiziert: Ionol (2,6-di-tert.-butyl-4-methylphenol) erkenntlich an den Massenpeaks m/e = 205 und 220, Phtalsäuredialkylester (charakteristische Massenpeaks m/e = 149, 167 und 278), Polyethylenglcol (mehrfache Abspaltungen mit m/e = 44) und Silicone (mehr-

---

6) Ich danke Herrn H. Bartholomä für die Durchführung der Messung

fache Abspaltungen mit m/e = 74). Andere Substanzen waren entweder für die Massenspektrometrie zu schwer flüchtig, oder wurden von den Verunreinigungen überdeckt.
Die Phtalsäuredialkylester sind eine Verunreinigung, die bei sehr vielen wassergelösten und auch bei Boden-Huminsäuren gefunden wurden, bei denen eine Beeinflußung durch zivilisationsbedingte Verunreinigungen, ebenso wie eine nachträgliche Kontamination im Labor ausgeschlossen werden konnte (1, 57, 96, 118). So wurden auch hier bei den aus aerob-thermophil abgebauten, nicht abwasserbeeinflußten Bakterienschlämmen gewonnenen Huminsäuren oftmals adsorbierte Phtalsäuredialkylester beobachtet.
Phtalsäuredialkylester müssen daher als natürlich auftretendes Stoffwechselendprodukt angesehen werden, bei den abwasserbeeinflußten Huminsäuren muß man allerdings von einer zivilisatorischen Kontamination ausgehen, wenn man an die weite Verbreitung dieser Substanzklasse als Kunststoffweichmacher denkt.

7.4.2. IR- und ^{1}H-NMR-Spektroskopie

Weitere Auskünfte über Vorgänge während der Reaktion mit Iodwasserstoffsäure lieferten die IR- und ^{1}H-NMR-Spektren der einzelnen mit organischen Lösungsmitteln abgetrennten Fraktionen.
Dadurch, daß die I^{-}-Anionen der Iodwasserstoffsäure in recht kurzer Zeit durch die Huminsäuren zu freiem Iod oxidiert wurden (in Blindversuchen ohne Huminsäure wurde Iod nicht nennenswert freigesetzt), wurde die etherspaltende Potenz der Iodwasserstoffsäure sehr schnell herabgesetzt und die eigentlich erwünschte Reaktion konnte nicht eintreten. Daß dennoch Etherspaltung eintrat, kann man an der Verunreinigung PEG abschätzen, die obligatorisch an Huminsäuren aus Klärschlämmen adsorbiert ist. Durch die Reaktionsbedingungen wurde PEG von den Huminsäuren desorbiert und mehr oder weniger gespalten. Damit erhielt man einen Indikator, mit dem die etherspal-

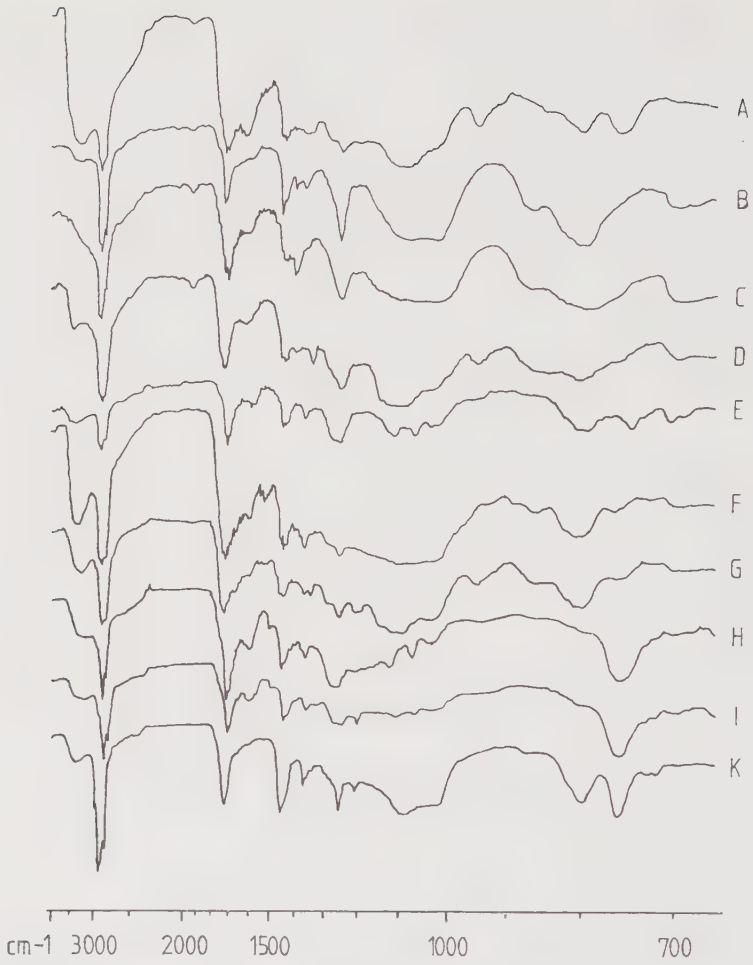


Abb. 24: IR-Spektren der organisch löslichen Produkte der Reaktionen mit Iodwasserstoffsäure (A - K im Text erläutert) (Perkin-Elmer-Spektrometer, Film auf NaCl-Scheibe, Referenz Luft)

tende Wirkung der einzelnen Reaktionsverfahren beobachtet werden konnte.

Beim Verfahren nach 4. ($CH_3OH/HI/H_2O$) ist im IR-Spektrum deut-

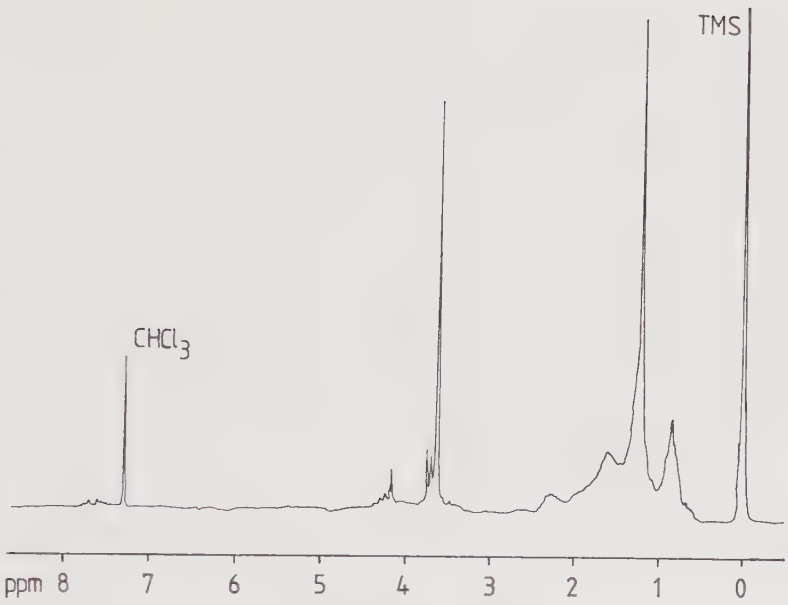


Abb. 25: ^{1}H-NMR-Spektrum des Reaktionsprodukts nach Verfahrenstyp 4 (80 MHz-Spektrometer, $CDCl_3$-d_1, TMS)

lich die CH_2-O-CH_2 -Valenzschwingung bei 1100 cm^{-1} zu erkennen (Abb. 24, K) und das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 25) zeigt bei 3,63 ppm stark ausgeprägt die singuläre Resonanz der Oxyethylengruppen. Dasselbe gilt für die Verfahrensweise nach 3. bei Anwendung von viel organischem Lösungsmittel und wenig wässriger Phase (Abb. 24, G und Abb. 26, II). Dabei fällt auch auf, daß PEG offensichtlich erst mit relativ polareren Lösungsmitteln wie Methylenchlorid und Chloroform extrahierbar wird (vgl. Abb. 26, I).

Wenn man bei diesem Verfahrensweg die organische Phase zu Gunsten der wässrigen Phase verringert, geht der Anteil an ungespaltenem PEG in den Extrakten etwas zurück (s. Abb. 24, D und Abb. 27, links).

Geht man nach 2. vor, so tritt noch mehr, aber immer noch unvoll-

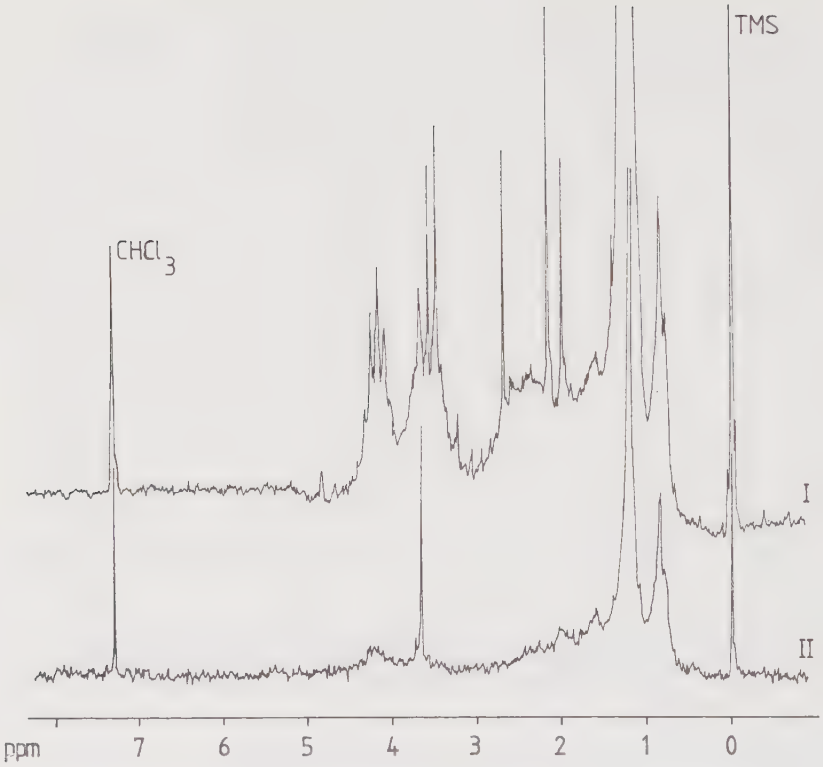


Abb. 26: ^{1}H-NMR-Spektren der Reaktionsprodukte nach Verfahrenstyp 3 mit großer organischer Phase (Cyclohexanextrakt I, Chloroformextrakt II) (80 MHz-Spektrometer, $CDCl_3$-d_1, TMS)

ständige Etherspaltung am PEG ein (siehe Abb. 24, A und Abb. 28, I und II, Abb. 29). Die Spaltung des PEG wird bei Anwendung einer hohen Iodwasserstoffsäure-Konzentration (5 %) nach diesem Verfahrenstyp fast vollständig (s. Abb. 24, B und C, Abb. 30).

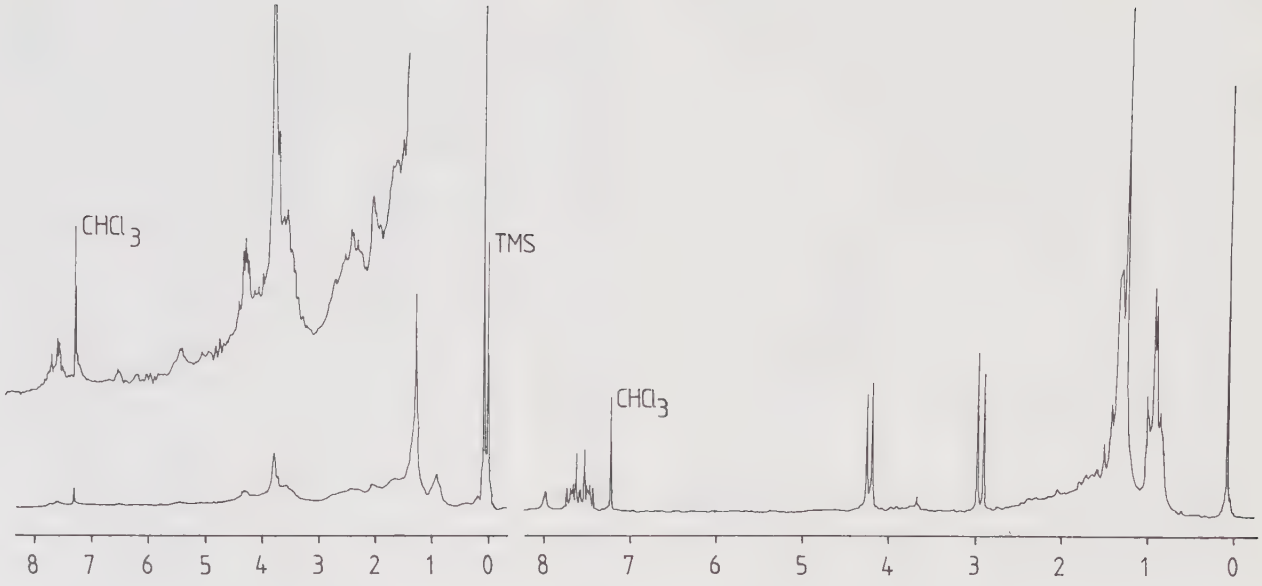


Abb. 27: ^{1}H-NMR-Spektren der Reaktionsprodukte nach Verfahrenstyp 3. mit kleiner organischer Phase
(links: Huminsäure aus Klärschlamm) (rechts: Braunkohlehuminsäure)
(80 MHz-Spektrometer, $CDCl_3$-d_1, links mit TMS)

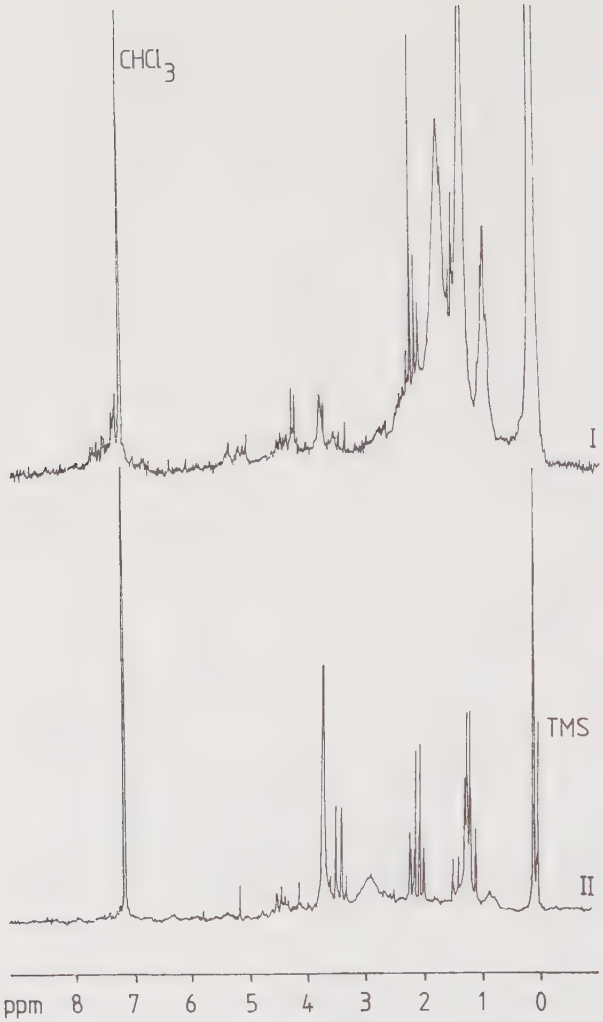


Abb. 28: ^{1}H-NMR-Spektren der Reaktionsprodukte nach Verfahrenstyp 2. mit wenig Iodwasserstoffsäure (Diethyletherextrakt I, Chloroformextrakt II)
(80 MHz-Spektrometer, $CDCl_3$-d_1, II mit TMS)

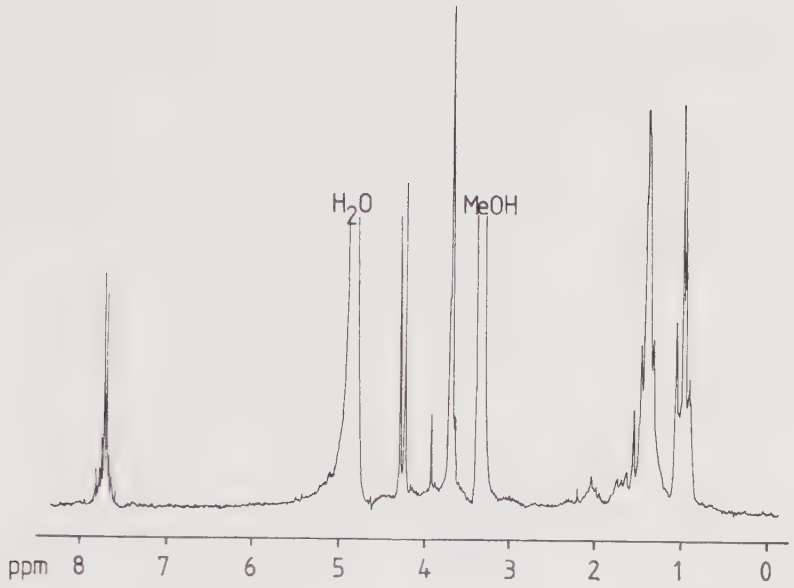


Abb. 29: ^{1}H-NMR-Spektrum des Reaktionsprodukts nach Verfahrenstyp 2. mit wenig Iodwasserstoffsäure (Methanolextrakt) (80 MHz-Spektrometer, CD_3OD-d_4)

7.4.3. Diskussion

Die Ursache der unterschiedlich stark auftretenden Etherspaltung, die hier an einer leicht spektroskopisch detektierbaren Indikatorsubstanz, dem PEG, das ohnehin als Verunreinigung der Huminsäuren vorlag, verfolgt werden konnte, dürfte zwei Gründe haben. Zum einen spielt wohl die Konzentration an Iodwasserstoffsäure gegenüber der Huminsäure eine Rolle - erst ab einer vierfach höheren Iodwasserstoffsäure-Konzentration konnte deutlich Etherspaltung beobachtet werden. Zum anderen ist die Reaktionstemperatur von entscheidender Bedeutung. In den Versuchsreihen mit Zweiphasensystemen konnte die Reaktionstemperatur nicht höher liegen als der Siedepunkt

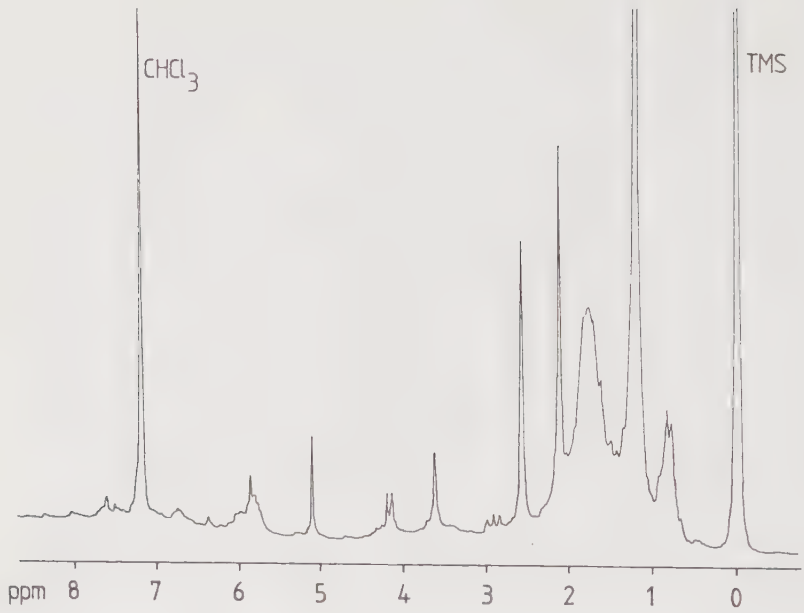
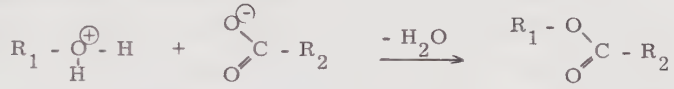


Abb. 30: ^{1}H-NMR-Spektrum des Reaktionsprodukts nach Verfahrenstyp 2. mit viel Iodwasserstoffsäure
(80 MHz-Spektrometer, $CDCl_3$-d_1, TMS)

der organischen Phase und lag daher in der Regel unter 100 °C. Lediglich bei einem Versuch des Verfahrenstyps 3. mit kleiner organischer Phase (Toluol) wurde deutliche Etherspaltung am PEG beobachtet. Die Reaktionstemperatur sollte also wenigstens bei 100 °C liegen, wenn Etherspaltung eintreten soll, außerdem mußte die Konzentration an Iodwasserstoffsäure etwa viermal so hoch wie die Huminsäurekonzentration sein.

Bei der Interpretation der IR-Spektren konnte eine weitere Substanzklasse identifiziert werden. Die Banden bei 1730 cm^{-1} (C=O - Valenzschwingung) und 1250 cm^{-1} (C-O - Valenzschwingung) sprechen stark für aliphatische Ester. Durch diese Annahme wurden auch einige ^{1}H-NMR-Spektren leichter verständlich. Signalgruppen mit mehr oder weniger deutlichen Aufspaltungsmustern bei 1,2 - 1,7 ppm und

3,5 - 3,8 ppm sprechen für Äthylgruppen in Nachbarschaft von Estergruppierungen, also für Äthylester. Die Bildung von Estern bei den vorliegenden Reaktionsbedingungen erscheint einleuchtend.
Als erster Schritt werden analog der Reaktionsgleichung (1) (Seite 69) Oxoniumionen durch Protonierung geeigneter Gruppen gebildet. Da in den Huminsäure-Molekülen freie Carboxylgruppen vorliegen, kann das Säureanion als Nucleophil im zweiten Reaktionsschritt mit dem Oxoniumion zu Estern abreagieren:

(3) 

Dieser Mechanismus wird einerseits dadurch begünstigt, daß die stärker nucleophilen I^--Anionen durch Oxidation zum freien Iod nicht mehr zur Reaktion zur Verfügung stehen, und andererseits durch die organische Phase entstandene Ester aus der Gleichgewichtsreaktion entfernt werden. Voraussetzung dafür ist allerdings, daß Carboxylgruppen tragende Reste vom Huminsäuremolekül abgespalten werden. Dies würde auch erklären, warum die anfangs gelösten Huminsäuren schon bald nach Reaktionsbeginn unlöslich werden. Es sind wohl im wesentlichen periphere Carboxylgruppen, die die Wasserlöslichkeit der Huminsäuren vermitteln. Werden diese Gruppen abgespalten oder verestert, wird das restliche Huminsäuremolekül wasserunlöslich und nimmt nicht mehr an der Reaktion teil.
Zum Vergleich wurden vereinzelt auch wasserlösliche Huminsäuren aus Braunkohle diesen Reaktionsverfahren unterworfen. Zum einen wurden auch diese Huminsäuren zu hohen Anteilen unlöslich, zum an deren wurde auch bei diesen Reaktionen Iodid zu freiem Iod oxidiert. In den organischen Extrakten dominierten vor allem Phtalsäuredialkylester, identifizierbar an den charakteristischen Banden bei 1110, 1060 und 1020 cm^{-1} in den IR-Spektren (s. Abb. 24, E, H, I) und den Signalgruppen bei 7,6 ppm (o-substituierter Aromat, J = 7,2 Hz) und 4,2 ppm (α-CH_2-Gruppe) im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 27, rechts).

Auch bei diesen Versuchen konnte Esterbildung beobachtet werden. Ein zusätzlicher Versuch, wobei die Iodwasserstoffsäure durch HCl ersetzt wurde, erbrachte für die Huminsäure aus Braunkohle vergleichbare Ergebnisse zur Reaktion mit Iodwasserstoffsäure (Abb. 24, I). Damit wird deutlich, daß die Abspaltung peripherer, Carboxylgruppen tragender Bausteine aus den Huminsäuren nicht durch eine Etherspaltung im Huminsäuremolekül hervorgerufen sein muß.
Somit bleibt es fraglich, ob bei diesen Reaktionsbedingungen in den Versuchen mit Iodwasserstoffsäure überhaupt am Huminsäuremolekül Etherspaltung stattgefunden hat. Vermutlich reichte die etherspaltende Potenz der Iodwasserstoffsäure gerade noch dazu aus, von den Huminsäuren desorbiertes PEG zu spalten, bevor die I^--Anionen zu freiem Iod oxidiert wurden. Außerdem wurde ein großer Teil der Huminsäure sehr schnell unlöslich, so daß die meisten Etherbrücken gar nicht mehr angreifbar waren.
Bemerkenswert bleibt noch ein Versuch nach den Bedingungen des Typs 2. mit niedriger HI-Konzentration (HS : HI = 1 : 2), bei dem es gelang durch Extraktion des Reaktionsgemisches einige Stoffgruppen von einander zu trennen. Die erhaltenen ^{1}H-NMR-Spektren (Abb. 28, I und II, Abb. 29) konnten zwar nicht näher interpretiert werden, ließen aber auf Grund ihrer Aufspaltungsmuster auf relativ kurzkettige (Äthyl-, i-Propyl-) Ester und Ether schließen. Im Methanolextrakt wurde einmalig ein Terephtalsäureester beobachtet (Signalgruppe bei 7,65 ppm, J = 1,1 Hz in der Abb. 29). Ob es sich hierbei um ein Artefakt, eine Verunreinigung der Huminsäure oder ein Reaktionsprodukt handelte, konnte nicht geklärt werden.

7.4.4. ^{13}C-Festkörper-NMR-Spektrum des gesamten Reaktionsgemisches

Eine wesentliche Schwierigkeit bei den Reaktionen von Huminsäure mit Iodwasserstoffsäure liegt darin, daß sich nur geringe Anteile der

Reaktionsprodukte so aufarbeiten lassen, daß sie wenigstens einer spektroskopischen Analyse zugänglich werden. Der weitaus größte Anteil verbleibt als unlöslicher Rückstand oder in einer wässrigen Lösung, die mit Salzen und freiem Iod versetzt ist. Es wurde daher noch ein weiterer Versuch unternommen, zu erkennen, ob mit Iodwasserstoffsäure überhaupt am Huminsäuremolekül eine etherspaltende Wirkung erzielt werden kann.

Dazu wurde eine Huminsäureprobe mit einem erheblichen Überschuß an Iodwasserstoffsäure 24 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde das gesamte Reaktionsgemisch vorsichtig abgedampft und die Restfeuchtigkeit durch Lyophilisation entfernt. Von diesem Reaktionsgemisch wurde ein ^{13}C-NMR-Festkörper-Spektrum aufgenommen (zur besseren Vergleichbarkeit ist das Spektrum im Kap. 7.6. in der Abb. 35 abgebildet).

Auch bei dieser Reaktion wurde das Iodid sofort zum freien Iod oxidiert, und tatsächlich lässt sich am Ethersignal keinerlei Veränderung erkennen. Damit verlief auch diese Reaktion wie die in den vorhergegangenen Versuchsreihen. Andererseits sind aber an Hand des NMR-Spektrums eine Reihe deutlicher Veränderungen zu erkennen. Endständige Alkylgruppen sind kaum mehr zu detektieren, dafür nimmt die Zahl von isomerisiertem und funktionalisiertem Kohlenstoff im aliphatischen Verschiebungsbereich deutlich zu (30 - 60 ppm). Die Ketal- und Acetalgruppierungen (101 ppm) nehmen erheblich ab; es scheint, als seien unter diesen Bedingungen diese Gruppen gespalten worden, zumindest diejenigen, die so peripher im Strukturgerüst liegen, daß sie von den Agentien angreifbar waren.

Es ist entweder Decarboxilierung oder eine Reduktion der Carboxylgruppen durch die HI eingetreten (Rückgang des Signals bei 175 ppm), was die Wasserunlöslichkeit der Huminsäure bewirkte. Lediglich ein kleines Signal bei 170 ppm deutet noch auf restliche Estergruppierungen hin, die durch Veresterung von Carboxylgruppen entstanden sein könnten, oder schon vorher vorhanden waren.

Damit gelang auch hier keine Etherspaltung an Huminsäure durch HI.

7.5. Löslichkeit von Huminsäure

Bislang galten reine Huminsäuren als ausschließlich wasserlöslich und zwar in einem pH-Bereich von pH 7 bis pH 14. Lediglich die als Hymatomelan- und Fulvosäure bezeichneten Fraktionen (siehe Fraktionierungsschema nach Pierce/Felbeck Abb. 14, S. 47) waren auch in Ethanol, bzw. in stark saurer Lösung bis pH 1 vollständig löslich. Dies deckte sich auch mit eigenen Beobachtungen, die die ausschließliche Wasserlöslichkeit der verschiedenen Huminsäuren, die aus Klär- und Bakterienschlämmen isoliert wurden, bestätigten.
Auch Versuche, die Huminsäuren mit Hilfe von Erwärmen und/oder Ultraschall in den verschiedensten organischen Lösungsmitteln zu lösen, erbrachten außer einer gelegentlichen Suspendierung keine Resultate.
Ein weiterer Versuch brachte ein überraschendes Ergebnis:
Wenige Milliliter einer konzentrierten wässrigen Huminsäurelösung wurden unter Rühren vorsichtig mit der 10 - 20-fachen Menge an Methanol versetzt. Lediglich ein geringes Ausflocken aus der braunen Alkohollösung war zu beobachten. Nun wurde mehrfach über Natriumsulfat filtriert, bis weitgehende Wasserfreiheit der alkoholischen Huminsäurelösung erreicht wurde. Die erhaltene Lösung blieb auch nach wochenlangem Stehenlassen klar und stabil. Nach dem Einrotieren des Methanols wurde die Huminsäure zurüchgewogen. Es wurden 67 - 95 % der eingesetzten Huminsäure zurückerhalten (Mittelwert bei 90 %).
Die so erhaltene Huminsäure war rückstandsfrei sowohl in Wasser, wie auch erneut in Methanol löslich. Im IR-Spektrum erwies sich diese Huminsäure als identisch mit der eingesetzten Huminsäure, ebenso im ^{1}H-NMR-Spektrum. Wurde die methanollösliche Huminsäure in Wasser gelöst und anschließend lyophilisiert, so war sie wieder wie zu Beginn des Versuchs ausschließlich wasserlöslich.

Ähnliche Versuche mit anderen Lösungsmitteln erbrachten lediglich noch für DMSO ein analoges Verhalten.

Zu wenigen Millilitern einer konzentrierten wässrigen Huminsäurelösung wurde unter Rühren vorsichtig die 20-fache Menge an DMSO zugegeben. Ausgeflocktes wurde abfiltriert, getrocknet und gewogen. Der DMSO-unlösliche Rückstand betrug 10 - 20 % der eingesetzten Huminsäure. Das Wasser wurde durch mehrfaches Einrotieren bei einer Badtemperatur von 100 °C abdestilliert. Die DMSO/Huminsäure-Lösung blieb ebenfalls stabil und klar. Da ein vollständiges Entfernen der DMSO von der Huminsäure durch Abdestillation bei vertretbaren Temperaturen nicht gelang, wurden auch keine spektroskopischen Untersuchungen durchgeführt.

Dieses eigenartige Löslichkeitsverhalten der Huminsäuren scheint darauf hinzudeuten, daß die Huminsäuremoleküle in wässriger Lösung in der Lage sind, ihre räumliche Struktur so zu verändern, daß sie auch für weniger polare Lösungsmittel wie Methanol und DMSO solvatisierbar werden. Daß eine Adsorption, oder eine Einlagerung von Wasser an Stelle von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen stattfand, konnte durch die Gewichtsbestimmungen ausgeschlossen werden. Die Veränderung der räumlichen Struktur in Lösung ist umso leichter vorstellbar, als die Struktur der hier untersuchten Huminsäuren überwiegend aliphatischer Natur ist, und somit bei freier Drehbarkeit um C - C-Bindungen Änderungen in der räumlichen Anordnung einzelner Strukturelemente zueinander schon durch den Energiegewinn aus Solvatationseffekten möglich sein könnte. Durch solch eine Änderung in Lösung würden dann andere, weniger polare Strukturelemente für die Solvatation durch Methanol oder DMSO zugänglich.

7.6. NMR-spektroskopische Untersuchungen

Seit 1976 wird zur Strukturuntersuchung an Huminsäuren mit zunehmendem Erfolg die Kernresonanzspektroskopie eingesetzt (7, 72, 119 - 141). Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen wurde bald

deutlich, daß Huminsäuren alters- und standortspezifisch unterschiedliche Strukturen mit allerdings ähnlichen Grundmustern aufweisen. Es zeigte sich auch, daß die angewandten Isolations- und Reinigungsmethoden das Huminsäuregerüst erheblich beeinflußen können. Die wohl wichtigste Erkenntnis aus den kernresonanzspektroskopischen Untersuchungen war aber, daß aromatische Strukturelemente nicht das entscheidende Bindungsprinzip in der Huminsäurestruktur darstellen, sondern daß vielmehr aliphatische und funktionalisierte aliphatische Strukturelemente den Aufbau des Huminsäuregerüsts bestimmen. Auch in der vorliegenden Arbeit sollen die Kernresonanzspektren in den Vordergrund der Strukturdiskussion gestellt werden.

Die ^{1}H-NMR-Spektren der Huminsäuren können in drei wesentliche Verschiebungsbereiche eingeteilt werden: den aliphatischen Bereich, den Polyäther- und Acetalbereich und den aromatischen Bereich.

7.6.1. Aromatischer Verschiebungsbereich

In den ^{1}H-NMR-Spektren der Huminsäuren aus aerob-thermophil abgebauten Klärschlämmen sind im aromatischen Verschiebungsbereich zwischen 6,0 und 8,0 ppm häufig kleine und unstrukturierte Signale bei 7,4 und 7,7 ppm zu erkennen (Abb. 31, A und B). Auch bei den Huminsäuren aus aerob-thermophil abgebauten, mit Zucker und Milch ernährten Bakterienschlämmen sind bei 6,8 und 7,3 ppm Andeutungen aromatischer Resonanzen zu erkennen (Abb. 31, C und D). Die Signalintensitäten sind jedoch allesamt so niedrig, daß aus den ^{1}H-NMR-Spektren keine Hinweise auf wesentliche aromatische Strukturanteile entnommen werden können.
Dies wird auch von den ^{13}C-NMR-Festkörper-Spektren bestätigt, wo zwischen 110 bis 165 ppm keine Signale aromatischen Kohlenstoffs zu beobachten sind (Abb. 34, A und B). Anders verhält es sich bei dem Vergleichsspektrum einer Boden-Huminsäure (Abb. 34, C), wo bei 121 und 151 ppm breite Resonanzberge für aromatischen Kohlen-

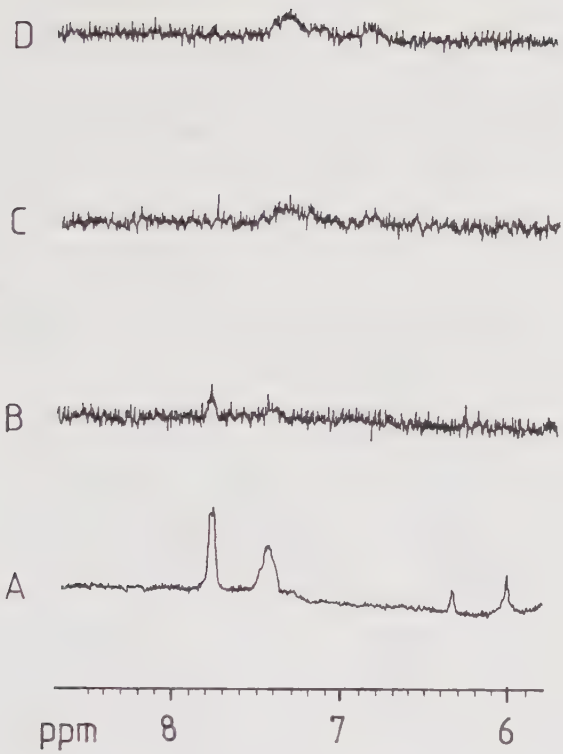


Abb. 31: Aromatischer Verschiebungsbereich der ^{1}H-NMR-Spektren von Huminsäuren aus aerob-thermophil abgebauten Klärschlämmen (A, V 11 und B, V 23) und mit Zucker (C, V 18) und Milch (D, V 21) ernährten Bakterienschlämmen (400 MHz-Spektrometer, 1516 (A), 400 (B), 972 (C) und 428 (D) scans, D_2O, gated-decoupling)

stoff zu sehen sind. Jedoch beträgt der Anteil aromatischen Kohlenstoffs am gesamten Kohlenstoff der vermessenen Huminsäure, bestimmt an Hand der Integrationsdaten, lediglich 19%. Damit zeigt sich, daß auch bei dieser Bodenhuminsäure die aromatischen Strukturelemente den Aufbau des Huminsäuregerüsts nicht dominieren.

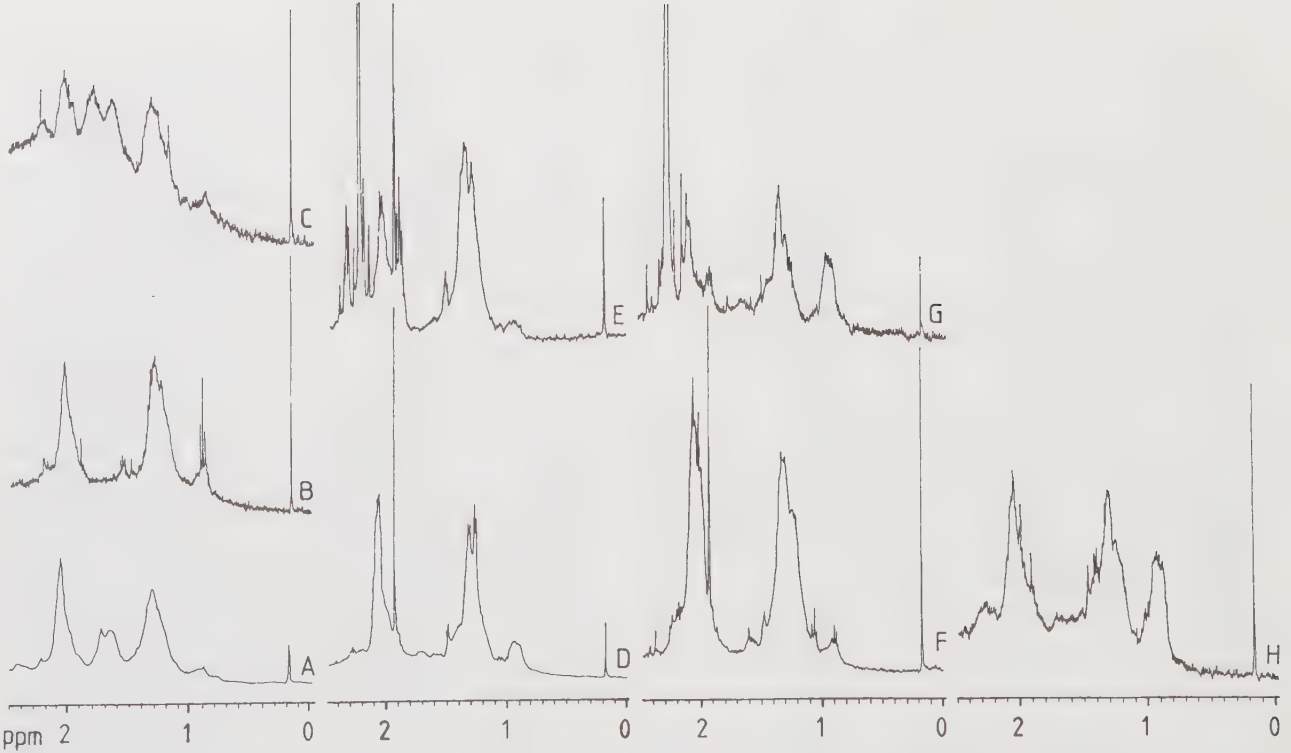


Abb. 32: Aliphatischer Verschiebungsbereich der ^{1}H-NMR-Spektren vun Huminsäuren aus Bakterienschlämmen

7.6.2. Aliphatischer Verschiebungsbereich

In den ^{1}H-NMR-Spektren (Abb. 32) ist einheitlich für alle Huminsäuren bei 0,18 ppm ein scharfes singuläres Signal zu erkennen, das Siliconen zugeordnet werden muß. Dabei lässt es sich nicht entscheiden, ob es sich um eine Verunreinigung der Huminsäuren bei der Isolation durch Schliffett während des Lyophilisierens oder eine schon beim aerob-thermophilen Abbau an die sich bildenden Huminsäuren adsorbierte Substanz handelt.
Die Resonanz bei 0,9 ppm kann endständigen Methylgruppen an einer Alkylkette zugeordnet werden, wie auch das vereinzelt deutlich auftretende Aufspaltungsmuster zu einem Triplett (Abb. 32, B und F) beweist. Ebenso handelt es sich bei der vereinzelt gut erkennbaren kleinen Resonanz bei 1,1 ppm (Abb. 32, F) um eine Methylgruppe in Nachbarschaft zu einer CH_2-Gruppe, die ihrerseits aber einer Verzweigung der Kohlenstoffkette benachbart ist.
Der Anteil von solchen Methylgruppen an Alkylresten an der Gesamtstruktur ist bei allen Huminsäuretypen recht unterschiedlich (Abb. 32, E und G). Der Anteil dieses Methylwasserstoffs am gesamten Wasserstoff des Huminsäuremoleküls schwankt nach Auswertung der Integrationsdaten zwischen 0,1 und 6 %. Das bedeutet, daß endständige Alkylgruppen an der Huminsäurestruktur nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Für die Zuordnung des Resonanzberges bei 1,3 ppm bieten sich mehere Möglichkeiten an. Einerseits handelt es sich wohl um CH_2-Gruppen in längerkettigen Alkylresten, andererseits kann es sich auch um Methylgruppen in ß-Stellung zu einer Sauerstoffunktion han-

---

Legende zu Abb. 32 (nebenstehend):

A - C Huminsäure aus Klärschlamm (V 11, V 15, V 23)
D - G Huminsäure aus zuckerernährtem Bakterienschlamm (V 13, V 17, V 12, V 18)
H Huminsäure aus milchernährtem Bakterienschlamm (V 21)
(400 MHz-Spektrometer, 1516, 128, 400, 136, 1236, 360, 972 und 428 scans, D_2O, gated-decoupling)

deln. Da es sich bei dieser Signalgruppe damit um eine Überlagerung der Resonanzen verschiedener CH_2- und CH_3-Gruppen handelt, kann man auch trotz der bei den Huminsäuren aus zuckerernährtem Bakterienschlamm auftretenden Strukturierung dieser Signalgruppe (Abb. 32, D), keine eindeutige Zuordnung vornehmen.

Ein häufig auftretendes kleines Signal bei 1,5 ppm lässt sich CH_2-gruppen in γ-Stellung zu einer Carboxyl- oder Esterfunktion zuordnen (Abb. 32, B, D, E).

Bei den Huminsäuren aus Klärschlamm traten in den ^{1}H-NMR-Spektren vereinzelt unstrukturierte Resonanzberge bei 1,7 ppm auf (Abb. 32, A, C), die CH_2-Gruppen in Nachbarschaft zu Verzweigungen in Alkylketten zugeordnet werden könnten.

Charakteristisch für die ^{1}H-NMR-Spektren von Huminsäuren sind die unstrukturierten Resonanzberge bei 2,0 ppm, die ebenfalls aus einer Überlagerung der Resonanzen verschiedener Gruppierungen gebildet werden. In diesem Bereich treten die Resonanzen von CH_2-Gruppen auf, die in ß-Stellung zu Carboxyl-, Ester- oder Etherfuntionen stehen. Auch die Resonanzen von Methinprotonen sind hier zu beobachten.

In den Spektren der Huminsäuren aus zuckerernährtem Bakterienschlamm treten häufiger starke singuläre Resonanzen bei 1,9 und 2,2 ppm auf (Abb. 32, D - G), die von Methylgruppen herrühren, die in Nachbarschaft zu Kohlenstoff stehen, der selber keinen Wasserstoff trägt, sondern mit den restlichen drei Valenzen mit weiterem Kohlenstoff oder Sauerstoff verbunden ist. Solche Gruppierungen waren vereinzelt auch bei den anderen Huminsäuren zu beobachten (hier nicht abgebildet). Um auszuschließen, daß es sich um die Methylresonanz von Aceton handelte (aus unvollständig getrockneten Meßröhrchen), wurde mehrmals solche Messungen wiederholt, die dann aber diesselben Spektren lieferten.

Die ^{13}C-NMR-Festkörper-Spektren (Abb. 34) bestätigten die bisher gegebene Interpretation der ^{1}H-NMR-Spektren. Die Signale bei 19

und 24 ppm lassen sich den Methyl- bzw. Methylengruppen endständiger Alkylreste zuordnen, dabei deutet das Intensitäts- und Integrationsverhältnis dieser beiden Signale auf relativ kurzkettige Alkylgruppen hin (Abb. 34, A und B). Etwas andere Verhältnisse sind bei der Bodenhuminsäure gegeben (Abb. 34, C), wo die Methylenresonanz der Alkylgruppen das Signal für die Methylgruppen fast vollständig überdeckt, und auf einen wesentlich höheren Anteil an längerkettigen Alkylresten an der Gesamtstruktur der Bodenhuminsäuren gegenüber den Huminsäuren aus Klärschlamm hindeutet.

Die Resonanzen für Methingruppen, Methylen- und Methylgruppen in α- und ß-Stellung zu Verzweigungen, ß- und γ-Stellung zu Carboxyl- und Ethergruppierungen liegen im Bereich von 30 bis 60 ppm und sind im einzelnen nur schwach strukturiert. Das Verhältnis des Kohlenstoffs dieser Gruppierungen zum Kohlenstoff der Alkylgruppen beträgt an Hand der Integrationsdaten bei den Huminsäuren aus den aerob-thermophilen Abbauversuche etwa 1 : 1.

7.6.3. Polyether- und Acetalverschiebungsbereich

Bei den Huminsäuren aus abgebautem Klärschlamm ist in den ^{1}H-NMR-Spektren auf einen breiten, unstrukturierten Resonanzberg zwischen 3,2 und 4,5 ppm ein singuläres Signal bei 3,65 ppm aufgesetzt (Abb. 33, A und B), das den Methylengruppen von Polyethylenglycol zugeordnet werden kann, das an die Huminsäuren adsorbiert ist. Daß es sich bei den $(-O-CH_2-CH_2-)_n$-Gruppierungen nicht um ein Strukturelement der Huminsäuren handelt, wird von den ^{1}H-NMR-Spektren der Huminsäuren aus milch- und zuckerernährten Bakterienschlämmen (Abb. 33, C - F) bewiesen, wo diese singuläre Resonanz auf demselben Resonanzberg nicht auftritt. Jedoch zeigen die Spektren der Huminsäuren aus zuckerernährtem Bakterienschlamm jeweils bei 3,65 ppm das Maximum des hier besser strukturierten Resonanzberges zwischen 3,2 und 4,5 ppm auf. Es können also in

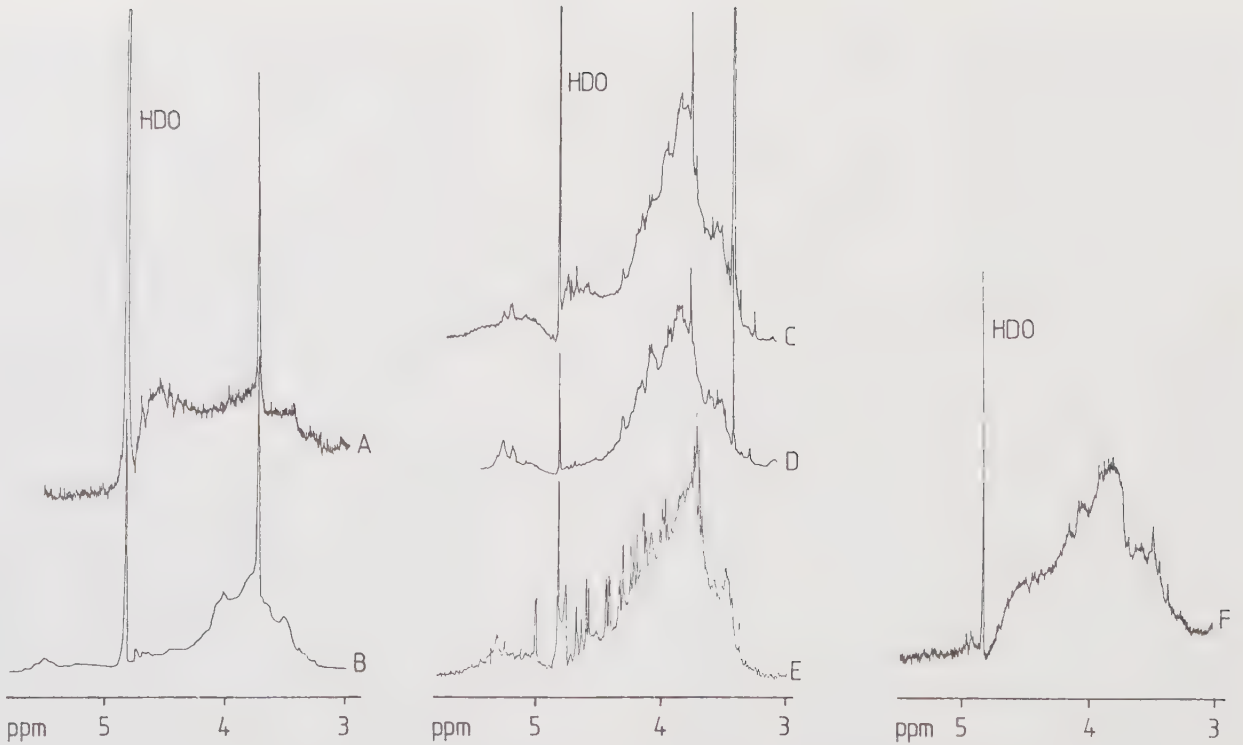


Abb. 33: Polyether- und Acetalbereich der ^{1}H-NMR-Spektren von Huminsäuren aus Bakterienschlämmen

der Huminsäurestruktur vereinzelt aber wiederholt durchaus (-O-CH_2-CH_2-O-)-Gruppierungen auftreten. Insgesamt ist der gesamte Resonanzberg zwischen 3,2 und 4,5 ppm im wesentlichen Methylen- und Methingruppen in Nachbarschaft zu einfach gebundenem Sauerstoff (Ethersauerstoff) zuzuordnen.
Die vereinzelt auftretende singuläre Resonanz bei 3,3 ppm wird durch die Methylprotonen von Methoxygruppen verursacht.
Die eindeutige Zuordnung dieses Resonanzberges zu Etherbindungen wird erst durch die Interpretation der ^{13}C-NMR-Festkörper-Spektren (Abb. 34) möglich. Das ausgeprägte Signal bei 73 ppm steht für -$\overset{|}{\underset{|}{C}}$-O- Gruppierungen, so daß die Deutung der ^{1}H-NMR-Spektren eindeutig erscheint.
Damit scheint das entscheidende Bindungsprinzip nativer Huminsäuren die Verknüpfung über Etherbrücken zu sein.

Neben den Ethergruppierungen können in diesem Verschiebungsbereich der ^{1}H-NMR-Spektren auch noch an Estergruppen gebundene Methylengruppen Resonanzen verursachen. Außerdem könnten hier auch noch Methylengruppen in Nachbarschaft zu primärem, sekundärem und tertiärem Stickstoff Signale ergeben, die aber eher im Bereich von 4 - 5 ppm vorliegen würden. Tatsächlich kann man in den mehr Stickstoff enthaltenden Huminsäuren aus milchernährtem Bakterienschlamm und der Huminsäure aus Tübinger Klärschlamm im ^{1}H-NMR-Spektrum in diesem Bereich eine Schulter des Resonanzberges erkennen (Abb. 33, A und F), die bei den anderen Huminsäuretypen nicht auftritt.

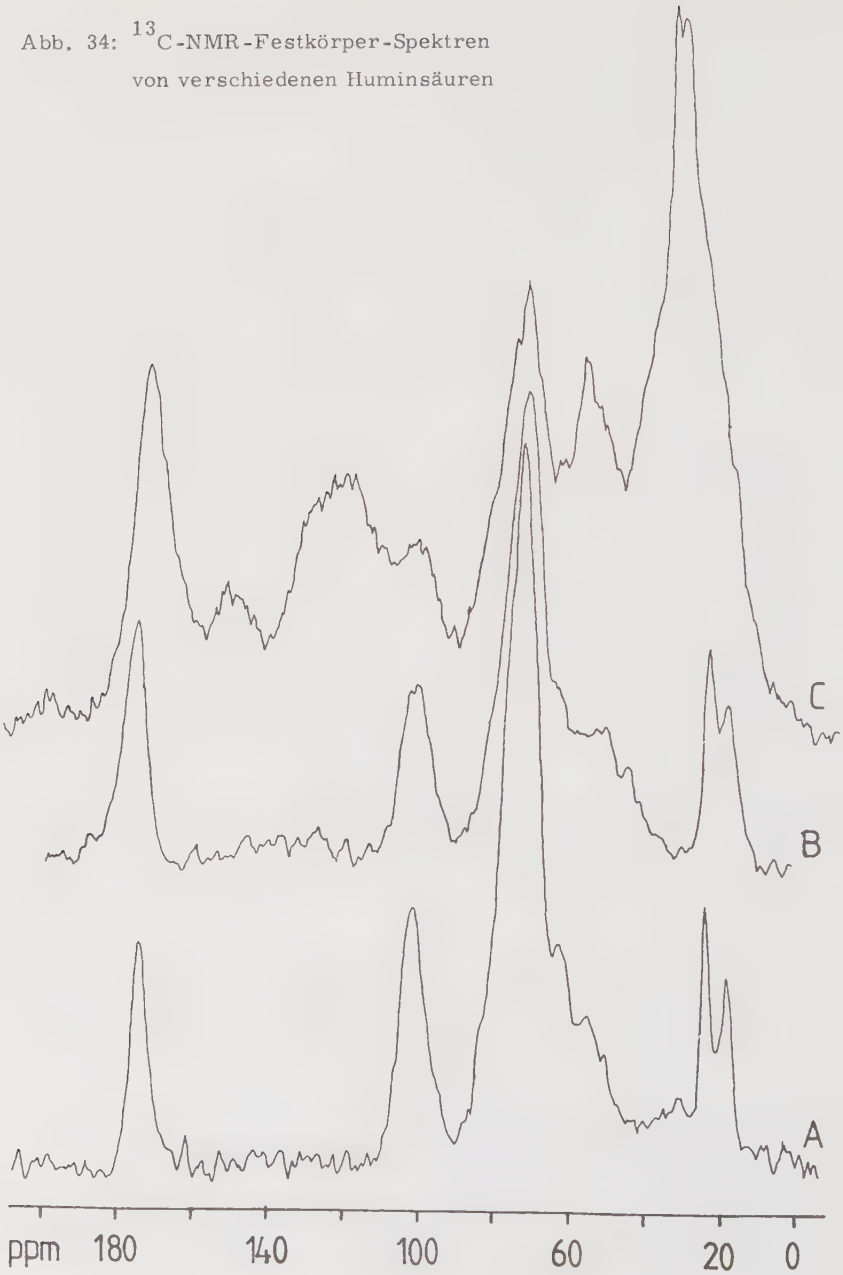
Bei den ^{13}C-NMR-Festkörper-Spektren tritt bei 101 ppm ein Signal auf, für das es nur zwei Deutungsmöglichkeiten gibt. Entweder han-

---

Legende zu Abb. 33 (nebenstehend):

A, B Huminsäure aus Klärschlamm (V 23, V 11)
C - E Huminsäure aus zuckerernährtem Bakterienschlamm (V 12, V 13, V 17)
F Huminsäure aus milchernährtem Bakterienschlamm (V 21)
(400 MHz-Spektrometer, 400, 1516, 360, 136, 1236 und 428 scans, D_2O, gated-decoupling)

Abb. 34: ^{13}C-NMR-Festkörper-Spektren von verschiedenen Huminsäuren



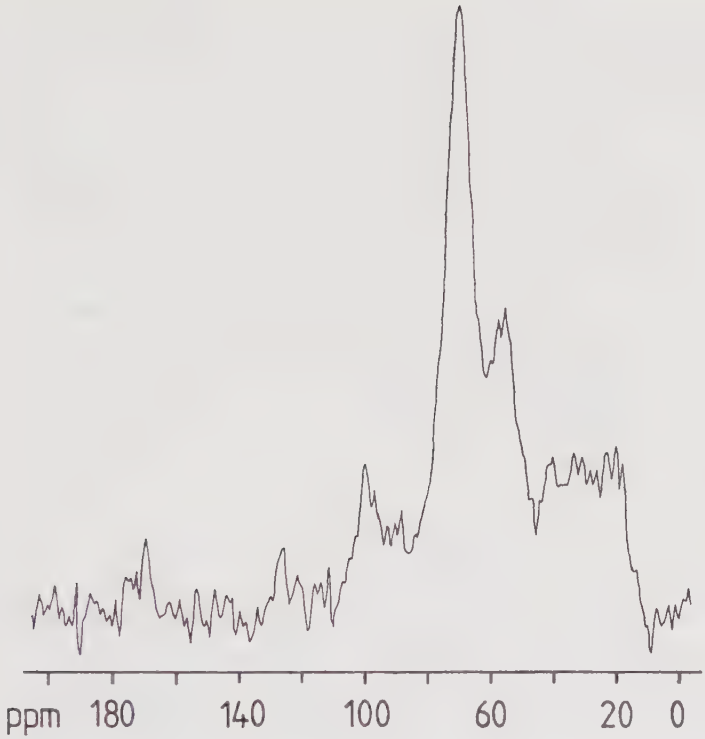


Abb. 35: ^{13}C-NMR-Spektrum des getrockneten Reaktionsrückstandes einer Huminsäure mit Iodwasserstoffsäure (s. Kap. 7.4.4.) (50 MHz-Spektrometer, cross-polarization, magic-angle-spinning, 2076 scans)

Legende zu Abb. 34 (nebenstehend):

A Huminsäure aus zuckerernährtem Bakterienschlamm (V 12)
B Huminsäure aus Klärschlamm (V 11)
C Bodenhuminsäure [7]
(50 MHz-Spektrometer, cross-polarization, magic-angle-spinning, 402, 374, 500 scans)

---

7) Ich danke Herrn Prof. Dr. Ziechmann vom Interfakultativen Lehrgebiet Chemie der Universität Göttingen für die Überlassung einer Bodenhuminsäureprobe (Podsol-Boden, B_h-Horizont, Fuhrberg)

delt es sich um Acetal- und Ketalgruppen, oder um Ringsysteme wie Furan oder Pyrrol. Durch das Fehlen von Resonanzen im heteroaromatischen Verschiebungsbereich der ^{1}H-NMR-Spektren lassen sich solche Heterocyclen jedoch ausschließen. Außerdem zeigen viele ^{1}H-NMR-Spektren bei 5,3 ppm ein kleines, schwach strukturiertes Signal, das Acetalgruppen zugeordnet werden kann. Dadurch kann man auch die Aussage machen, daß das Signal bei 101 ppm in den ^{13}C-NMR-Festkörper-Spektren überwiegend Ketalgruppen zugeordnet werden muß, die ja in den ^{1}H-NMR-Spektren keine Resonanzen verursachen können. Das Verhältnis von Ketal- und Acetalkohlenstoff zu Kohlenstoff in Etherbindungen, ermittelt an Hand der Integrationsdaten, beträgt bei den nativen Huminsäuren übereinstimmend etwa 1 : 4.

7.6.4. Carboxyl-Verschiebungsbereich

In den ^{13}C-NMR-Festkörper-Spektren tritt bei 174 ppm ein Signal auf, daß man entweder Carboxyl-, oder Ester- und Carboxylgruppen zuordnen kann (das Maximum eines Signals, das nur Estergruppen repräsentiert läge bei 170 ppm). Dies lässt sich erst an Hand des ^{13}C-NMR-Festkörper-Spektrums der mit einem großem Überschuß an Iodwasserstoffsäure behandelten Huminsäure (Abb. 35) entscheiden, wo dieses Signal fast vollständig verschwunden ist. Bei diesen Reaktionsbedingungen (24 Stunden Rüchfluß bei hohem HI-Überschuß, s. Kap. 7.4.4.) war eher Decarboxilierung oder Reduktion der Carboxylgruppen zu erwarten, jedoch kaum Esterspaltung.
Damit kann die Resonanz bei 174 ppm überwiegend Carboxylgruppen zugeordnet werden.

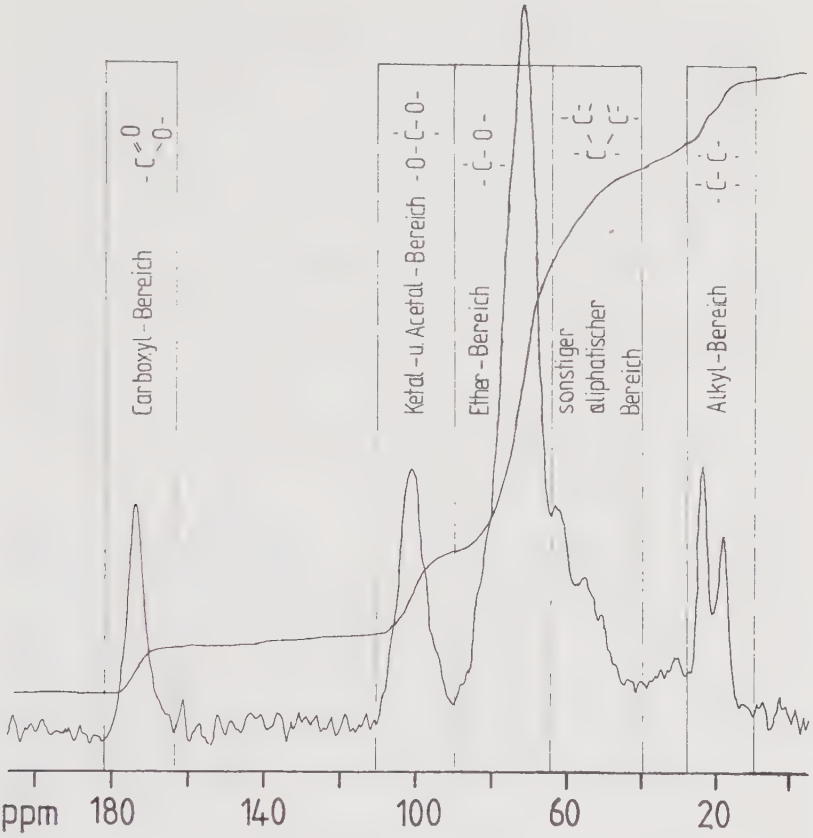


Abb. 36: Einteilung des ^{13}C-NMR-Festkörper-Spektrums aus Abb. 34, A in Verschiebungsbereiche zur Auswertung der Integrationsdaten

7.6.5. Kohlenstoff/Sauerstoff-Verhältnis aus den Integrationsdaten

Möchte man die Integrationsdaten von ^{13}C-NMR-Festkörper-Spektren zur Auswertung heranziehen, so muß man verschiedene Probleme berücksichtigen (217):

a) Die Überlappung von Signalen macht Aussagen über die Mengen

der diese Signale verursachenden Kohlenstoffatome ungenau.

b) Befinden sich in einem Molekül größere Bezirke, in denen kein Wasserstoff vorhanden ist, so wirkt in diesen Bezirken die Kreuzpolarisation nicht, und daher ergeben Kohlenstoffatome solcher Strukturbereiche keine Resonanzen. Allerdings muß der Durchmesser dieser Bezirke größer als 100 Å sein, um Kohlenstoffatome vollständig abzuschirmen.

c) Die freie Beweglichkeit einzelner Molekülgruppen (z.B. Methylrotation) insbesondere endständiger Gruppen, die nicht in einem dreidimensional vernetzten Strukturgerüst fixiert sind, macht sich in einer zu geringen Signalintensität bemerkbar. Eine Verbesserung der Aussagequalität der Integrationsdaten kann durch Optimierung der Kontaktzeiten bei der Messung, besonders an Hand von Vergleichssubstanzen erreicht werden.

Möchte man die Integrationsdaten der ^{13}C-NMR-Festkörper-Spektren der Huminsäuren auswerten, so muß man besonders auf die Einschränkungen, die durch die unter a) und c) beschriebenen Probleme gegeben sind, achten. Besonders für die terminal stehenden Carboxylgruppen ist eine Aussage über die Menge des Carboxylkohlenstoffs mit einiger Ungenauigkeit behaftet (wahrscheinlich wird weniger Carboxylkohlenstoff durch das Signal bei 174 ppm wiedergegeben, als tatsächlich im Molekül vorhanden ist).
für die Bestimmung der Mengenverhältnisse der Kohlenstoffe in einzelnen Gruppierungen zueinander fällt diese Ungenauigkeit nicht so wesentlich ins Gewicht, um nicht zumindest Größenordnungen dieser Verhältnisse angeben zu können.
Wie aus Abb. 36 ersichtlich ist, lässt sich recht gut zwischen Signalen von Kohlenstoff, der an Sauerstoff gebunden ist, und Signalen von Kohlenstoff, der mit weiterem Kohlenstoff verknüpft ist, unterscheiden. Aus den Integrationsdaten lassen sich für die einzelnen Verschiebungsbereiche folgende Zahlen ermitteln (wobei durch die oben diskutierten Einschränkungen diese Zahlen eher als Verhältnisse zueinander, denn als Absolutwerte verstanden werden müssen):

Alkyl-Kohlenstoff	11 %
sonstiger aliphatischer Kohlenstoff	11 %
Ether-Kohlenstoff	54 %
Ketal- und Acetal-Kohlenstoff	15,5 %
Carboxyl-Kohlenstoff	8,5 %

Ausgehend von diesen Zahlen und von der Annahme, daß auf je zwei Etherkohlenstoffe ein Sauerstoff und auf jeden Ketal-, und Carboxyl-Kohlenstoff zwei Sauerstoffatome entfallen, lässt sich das Kohlenstoff/Sauerstoff-Verhältnis zu

$$C : O = 1 : 0,75$$

abschätzen.

Rechnet man dieses Verhältnis auf Gewichtsanteile um, so müßte das Gewichtsverhältnis von Kohlenstoff zu Sauerstoff bei den nativen Huminsäuren gerade bei 1 : 1 liegen. Vergleicht man dies mit den Ergebnissen der Elementaranalysen (s. Kap. 6.1.), so ergibt sich eine recht gute Übereinstimmung (das Gewichtsverhältnis von Kohlenstoff zu Sauerstoff lag bei den Huminsäuren aus Klärschlamm gerade bei 1 : 1,1).

Auf Grund dieser aus spektroskopischen Daten ermittelten Ergebnisse konnte ein sinnvoller Zusammenhang zwischen Elementarzusammensetzung und den Strukturelementen der hier untersuchten Huminsäuren gegeben werden.

7.7. Zusammenfassende Diskussion der Untersuchungen zur Strukturaufklärung der Huminsäuren

Die Ergebnisse der Strukturuntersuchungen beziehen sich auf native, von Kontaminationen möglichst weitgehend frei gehaltene Huminsäuren. Dennoch drängen sich Verunreinigungen, die auf Grund der stark ausgeprägten adsorptiven Eigenschaften der Huminsäuren nahezu unvermeidlich sind, bei Versuchen zur Strukturaufklärung immer wieder in den Vordergrund. Hier sind besonders drei Substanzen zu

nennen:

a) Phtalsäuredialkylester sind praktisch bei allen Huminsäuren zu finden, gleich ob sie nun nachträglich bei der Isolierung oder Reinigung hinzugefügt wurden, oder ob diese Stoffwechselendprodukte schon auf natürlichem Weg adsorbiert worden sind.

b) Silicone konnten hier immer nachgewiesen werden. Ob sie als typische Laborverunreinigung zu gelten haben, oder ob sie schon im Verlauf des biologischen Entstehungsprozesses adsorbiert wurden, konnte hier nicht geklärt werden.

c) Polyethylenglycole sind in kommunalen Abwässern allgegenwärtig. Sie werden besonders gut von den beim biologischen Abwasserreinigungsprozess entstehenden Huminsäuren adsorbiert und damit dem weiteren biologischen Abbau entzogen. Daß sie eine typische Verunreinigung abwasserbestimmter Bakterienschlämme sind, konnte an Hand von Huminsäuren aufgezeigt werden, die aus Bakterienschlämmen isoliert wurden, die nicht mit Abwasserinhaltsstoffen in Berührung gekommen waren.
Dennoch war gerade diese Kontamination von Nutzen, die etherspaltende Potenz von Iodwasserstoffsäure auf die Huminsäuren abzuschätzen.

Nach wie vor ist es nicht gelungen, chemische Verfahren erfolgreich zur Strukturaufklärung der Huminsäuren einzusetzen. Im Vordergrund standen die kernresonanzspektroskopischen Untersuchungen, die auf Grund des hohen Auflösungsvermögens bei den ^{1}H-NMR-Spektren und der Möglichkeit zur Messung von Festkörpern wichtige Beiträge zur Strukturaufklärung lieferten.
So konnten eine Reihe von Strukturelementen und Verbindungsprinzipien der Huminsäuren deutlich gemacht werden:

a) Native Huminsäuren enthalten fast keine aromatischen Strukturelemente. Weder bei den ^{1}H-, noch bei den ^{13}C-NMR-Spektren konnten Hinweise auf aromatische oder heterocyclische Struktur-

anteile festgestellt werden. Allerdings scheint es leicht möglich zu sein, durch thermische und chemische Einflüsse solche aromatischen Elemente zu erzeugen, was auch der natürlichen Alterung von Huminsäuren in ihrer jeweiligen Umgebung entsprechen würde. So weisen Bodenhuminsäuren und noch mehr Huminsäuren aus Torf und Braunkohle aromatische Strukturelemente auf.

b) Das wichtigste Bindungsprinzip der nativen Huminsäuren sind Etherbrücken. Über die Hälfte aller Kohlenstoffatome sind an diesem Bindungstyp beteiligt. Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen lassen keine andere Aussage zu, die nicht zur Elementaranalyse, den Ergebnissen der IR-Spektroskopie oder dem chemischen Verhalten der Huminsäuren in Widerspruch stünde. Dennoch ist auch hier ein schlüssiger Beweis durch chemische Spaltung dieser Etherbrücken selbst mit Iodwasserstoffsäure nicht gelungen, da die etherspaltende Potenz dieses Agenz durch Oxidation des Iodids zum freien Iod schon zu Beginn der Einwirkung verloren ging.

c) Es wurden Hinweise auf vereinzelt auftretende Methoxy- und Aethoxygruppen erhalten, die aber nur einen geringen Beitrag zur Gesamtstruktur liefern.

d) Es wurden deutliche Hinweise auf Acetal- und vor allem Ketalgruppen erhalten. Sie waren die einzigen Gruppierungen, die einer chemischen Spaltung zugänglich waren, auch wenn das nicht der ursprüngliche Zweck der durchgeführten Reaktionen war.

e) Es wurden Carboxylgruppen ermittelt, die wahrscheinlich über aliphatische Reste an das Huminsäuremolekül gebunden sind. In den Reaktionen mit Iodwasserstoffsäure wurden einzelne Carboxylgruppen nach Abspaltung vom Huminsäuregerüst, möglicherweise durch Spaltung von Ketalfunktionen, verestert und konnten spektroskopisch nachgewiesen werden, die anderen Carboxylgruppen wurden bei diesen Reaktionen entweder reduziert oder decarboxiliert.

Estergruppen als Strukturelement der Huminsäuren scheiden auf Grund der spektroskopischen Erkenntnisse und der Reaktionsbedingungen bei den Reaktionen mit Säuren weitgehend aus.
Auch das Löslichkeitsverhalten der Huminsäuren spricht für eine große Anzahl peripher gelegener Carboxylgruppen, die die ausschließliche und gute Löslichkeit in Wasser und Laugen erklären würden.

f) Als endständige Gruppierungen sind auch Alkylgruppen zu nennen, die je nach Huminsäuretyp unterschiedlich häufig auftreten. Im Gegensatz zu älteren Bodenhuminsäuren scheinen diese Alkylgruppen nur kleine Kettenlängen aufzuweisen; im Vordergrund stehen wohl Aethyl-, Propyl- und Isopropylgruppen.

g) Überhaupt sind erhebliche Anteile des aliphatischen Kohlenstoffs in vielfach verzweigten und isomerisierten Strukturelementen vertreten. Die spektroskopischen Untersuchungen der Reaktionsprodukte von Iodwasserstoff- und Huminsäure sprechen für kurzkettige und stark verzweigte aliphatische Elemente.
So wurden Methyl- und Methylengruppen in Nachbarschaft zu Verzweigungen gefunden. Auch die Methinprotonen solcher Gruppierungen würden Resonanzen in den charakteristischen Signalgruppen der Huminsäure-NMR-Spektren erzeugen.

h) Bislang war es immer ein großes Problem,den hohen Sauerstoffanteil von 40 % und mehr sinnvollen Strukturelementen zuzuweisen. Diesmal wurde der umgekehrte Weg gegangen; aus spektroskopischen Daten wurde der Sauerstoffgehalt im Vergleich zum Kohlenstoffgehalt ermittelt. Dieses Verhältnis zeigte eine gute Übereinstimmung mit der Elementaranalyse.
Demnach sind rund 75 % der Sauerstoffatome in verbindenden Strukturelementen wie Etherbrücken und Ketalbindungen zu finden. Lediglich 25 % der Sauerstoffatome befinden sich in den terminalen Carboxylgruppen.
Damit stellen sich die Verbindungselemente, die einfach gebun-

denen Sauerstoff enthalten, in nativen Huminsäuren als entscheidendes Bindungsprinzip dar.

i) Die Frage, ob diese hier vorgestellten Strukturelemente in unregelmäßiger Reihenfolge und Anordnung, also eher zufällig, dreidimensional miteinander verknüpft sind, oder ob sich in der Struktur der Huminsäuren größere Strukturelemente mehrmals wiederholen, also ein polymerartiges Ordnungsprinzip vorherrscht, kann hier nicht schlüssig beantwortet werden.
Zwar deuten die scharfen Resonanzen im aliphatischen und im Polyetherbereich in einem der ^{1}H-NMR-Spektren von Huminsäure aus zuckerernährtem Bakterienschlamm (Abb. 32, E und Abb. 33, E) auf ein sich wiederholendes Strukturmuster hin, aber wie schon in Kap. 4.4. festgestellt wurde, sind wahrscheinlich mehere Arten thermophiler Mikroorganismen an der Bildung von Huminsäuren beteiligt. Diese Huminsäuren hätten dann wohl ähnliche aber nicht identische Strukturen. Bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung rufen dann solche ähnlichen Strukturelemente die bekannten unstrukturierten Resonanzberge hervor.

Es wäre vermessen, an dieser Stelle einen Strukturvorschlag für die nativen Huminsäuren zu machen; dafür reicht die Beweiskraft der Hinweise aus den spektroskopischen und chemischen Untersuchungen einfach noch nicht aus. Es konnten jedoch eine Vielzahl von Strukturelementen und Bindungsprinzipien in den nativen Huminsäuren in einem in sich schlüssig erscheinendem System vorgestellt werden.

III. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeines

1.1. Abkürzungen

BSB_5	Biochemischer Sauerstoffbedarf in 5 Tagen
DMSO	Dimethylsulfoxid
dT/dt	Steigung der Temperatur-Zeit-Kurve
EtOH	Äthanol
GC-MS	Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie
GR	Glührückstand (Asche)
PEG	Polyethylenglycol
PVC	Polyvinylchlorid
Q_{ges}	Gesamtreaktionswärme
Q_{spez}	Spezifische Reaktionswärme
T	Temperatur
T_{max}	Maximaltemperatur
t	Zeit
THF	Tetrahydrofuran
TS	Trockensubstanz
TS_{org}	Organische Trockensubstanz
ΔTS_{org}	Abnahme der organischen Trockensubstanz
V2A	Chrom-Vanadium-Legierung

1.2. Geräte

Elementar Analyser Model 240, Perkin-Elmer

IR-Spektrograph Infracord, Perkin-Elmer

Spektralphotometer PMQ II und M4Q III, Zeiss

NMR-Spektrometer WP 80, Bruker
NMR-Spektrometer WH 90, Bruker
NMR-Spektrometer WM 400, Bruker
NMR-Spektrometer CXP-300 FT, Bruker
Massenspektrometer MAT 711, Varian
Fraktionssammler Model 328, ISCO
UV-Detektor Model 1132 mit Multiplexer Expander Model UA-5, ISCO

Die Versuchsanlage zur Gewinnung abwasserfreier Bakterienschlämme ist auf Seite 11 (Abb. 1) abgebildet und die Funktionsweise auf den Seiten 9 - 11 beschrieben.
Der Laborreaktor zum aerob-thermophilen Abbau von Klär- und Bakterienschlämmen ist auf Seite 14 (Abb. 2) abgebildet und die Funktionsweise auf den Seiten 13 - 16 beschrieben.

2. Abwasser- und Schlammuntersuchungen

2.1. Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs

Die Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs erfolgte nach den Vorschriften der DEV (Deutsche Einheitsverfahren).
Je nach zu erwartendem Ergebnis wurde eine bestimmte Menge Abwasser in eine 300 ml fassende Winkler-Flasche gegeben. Die Flasche wurde mit sauerstoffgesättigtem Verdünnungswasser aufgefüllt, so daß keine Gasblase mehr in der Flasche verblieb.
Je Messung wurden 2 Proben, und je Meßreihe eine Blindprobe (ohne Abwasser) angesetzt. Die Flaschen wurden in einem thermostatisiertem Brutschrank bei 20 ^{o}C fünf Tage im Dunkeln aufbewahrt. Danach wurde mit einer luftgeeichten Sauerstoffelektrode die Sauerstoffkonzentration in den Flaschen gemessen.
Der BSB_5-Wert ergab sich aus folgender Formel:

$$BSB_5 \text{ (mg } O_2/l) = (Z - B) \times f$$

wobei $$f = V_F/V_P$$

darin bedeuten

Z Zehrung: Differenz der Sauerstoffkonzentration nach 5 Tagen
B Zehrung der Blindprobe
f Faktor
V_F Volumen der Flasche
V_P Volumen der Probe

Das Probenvolumen mußte so gewählt werden, daß die Sauerstoffkonzentration nach 5 Tagen zwischen 2 - 6 mg O_2/l betrug. Notfalls wurden mehere Verdünnungen angesetzt. Bei sehr konzentrierten Proben wurde vor der Messung mit dest. Wasser vorverdünnt.
Das Verdünnungswasser wurde aus Leitungswasser unter Zugabe von Nährsalzlösung I und II der Fa. Schmid, Entringen, angesetzt und 1 Woche belüftet, bis keine Zehrung mehr zu beobachten war.

2.2. Bestimmung der Schlammtrockensubstanz

Die Bestimmung der Trockensubstanz (Feststoffgehalt) der Klär- und Bakterienschlämme erfolgte nach den Vorschriften der DEV. 100 ml (50 ml) des Schlamms wurden über ein getrocknetes und gewogenes Faltenfilter (aschefrei) gegeben. Das Filter wurde im Trockenschrank bei 100 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach dem Rückwiegen wurde das erhaltene Gewicht mit dem Faktor 10 (20) multipliziert und die Trockensubstanz, bzw. der Feststoffgehalt der Probe in g/l angegeben.

2.3. Bestimmung des Glührückstands

Die Bestimmung des Glührückstands von Bakterienschlämmen und Huminsäuren erfolgte nach den Vorschriften der DEV.
In einem bei 500 °C ausgeglühten und gewogenen Porzellantiegel wurde entweder ein getrocknetes Faltenfilter mit Schlammrückstand oder eine eingewogene Menge an getrocknetem Schlamm oder Huminsäure gegeben. Der Tiegel wurde 20 Stunden bei 550 °C geglüht. Der erkaltete Tiegel mit der Asche wurde zurückgewogen. Der Glührückstand wurde in % der Einwaage (Trockensubstanz) angegeben.

2.4. Elementaranalyse

Die Elementarzusammensetzung der Bakterienschlämme und der Huminsäuren wurde für die Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel in % der Einwaage gemessen. Die einzelnen Werte wurden unter Berücksichtigung des Glührückstands auf die Prozentanteile der Elemente an der organischen Substanz nach der Formel

$$E = (X \times 100) / \Delta$$

umgerechnet, wobei

$\Delta = 100 - GR$

Darin bedeuten:

GR Glührückstand

Δ Glühverlust

X gemessener Prozentwert eines Elements

E berechneter Prozentanteil eines Elements an der organischen Substanz

Der Prozentanteil von Sauerstoff wurde aus der Differenz der gemessenen Elemente zu 100 % bestimmt.

2.5. Kenndaten der Versuchsanlage

a) Nährsubstrat Zucker (Kristallzucker KF 92 der Fa. Südzucker)

Zulaufbelastung	65	g BSB_5/d
Belebtschlamm-Volumen	950	ml/l
Belebtschlamm-Trockensubstanz	8	g/l
Belebtschlamm-Index	120	ml/g
Raumbelastung B_R	0,45	g BSB_5/l x d
Schlammbelastung B_{TS}	0,06	g BSB_5/g TS x d
Ablaufbelastung	0,3	g BSB_5/d
Abbauleistung	99,5	%

b) Nährsubstrat Milch (H-Milch der Fa. Südmilch)

Zulaufbelastung	45	g BSB_5/d
Belebtschlamm-Volumen	980	ml/l
Belebtschlamm-Trockensubstanz	6,5	g/l
Belebtschlamm-Index	150	ml/g
Raumbelastung B_R	0,32	g BSB_5/l x d
Schlammbelastung B_{TS}	0,05	g BSB_5/g TS x d
Ablaufbelastung	0,21	g BSB_5/d

3. Isolierung und quantitative Bestimmung der Huminsäuren

3.1. Herstellung der Ultrafiltrationsmembranen (asymetrische Polysulfonmembranen)

Man stellte eine 20 %-ige Lösung des Polymers PSF P 1700 NAT 11 bzw. PSF P 3500 NAT 11 (Fa. Union Carbide) in N-Methylpyrrolidon her. Dazu wurden 80 g Lösungsmittel auf 60 - 70 °C erwärmt, 20 g Polymer auf einmal zugegeben und über Nacht bei 60 - 70 °C weiter gerührt. Nach dem Abkühlen wurde soviel Methanol zugegeben, daß die Polymerkonzentration 17 - 17,5 % betrug. Danach wurde die Polymerlösung 30 min bei 3000 Upm zentrifugiert oder über eine Glasfritte filtriert. Die Polymerlösung wurde dann auf eine Glasplatte aufgegossen und mit einem Ziehstab zu einem Film von 0,2 - 0,3 mm Schichtdicke ausgezogen. Das Polymer wurde schließlich in einem Wasserbad bei 10 °C ausgefällt.
Durch Variation der Polymerkonzentration, sowie der Fällbadtemperatur wurden Membranen der unterschiedlichsten Ausschlußgrenzen erhalten. Diese Membranen wurden gegen käufliche Membranen UM 2 der Fa. Amicon mit bereits ultrafiltrierten Huminsäuren ausgetestet, um so die richtige Ausschlußgrenze (ca. 1000 dalton) auszuwählen.

3.2. Isolierung und quantitative Bestimmung der Huminsäuren

Eine bestimmte Menge aerob-thermophil abgebauter Schlamm wurde lyophilisiert. Der getrocknete und gewogene Schlamm wurde mit dest. Wasser, das zuvor mit NaOH an der pH-Elektrode auf pH 7,0 eingestellt worden war, kurz aufgeschlämmt und dann in ein grobporiges Faltenfilter gegeben. Es wurde solange dest. Wasser zugegeben, bis das Filtrat farblos und klar war. Diese Rohhuminsäurelösung wurde unmittelbar danach sterilfiltriert.

Dies geschah in einer Sterilfiltrationszelle mit vorgeschaltetem 1 l - Vorratsgefäß unter 3 bar Stickstoffdruck. Es wurde in drei Etappen filtriert, da diese Rohhuminsäurelösung sehr schlecht filtrierbar war. Zuerst wurde über normales Filterpapier, dann über ein Glasfaservorfilter (Selectron GF 92) und schließlich über ein Membranfilter (Selectron BA 83/1) der Porengröße 0,2 µm der Fa. Schleicher und Schüll filtriert.

Die Isolierung, Reinigung und Anreicherung der Huminsäuren wurde durch Ultrafiltration erreicht.

Das Sterilfiltrat wurde in einer Ultrafiltrationszelle mit vorgeschaltetem 5 l - Vorratsgefäß gegeben. Die Lösung wurde unter 3 bar Stickstoffdruck über Polysulfonmembranen mit einer Ausschlußgrenze von ca. 1000 dalton unter kräftigem Rühren aufkonzentriert. Anschließend wurde mit der 10 - 20-fachen Menge an doppelt destilliertem Wasser bis zur völligen Entsalzung diafiltriert (Nachweis auf Chlorid, Sulfat, Ammonium, Phosphat und Nitrat im Eluat negativ). Die aufkonzentrierte und diafiltrierte Huminsäurelösung wurde quantitativ in eine Wäageschale überführt, lyophilisiert und ausgewogen.

4. Hydrolyse mit 6 n HCl

100 mg einer Huminsäureprobe wurden in einem 100-ml-Rundkolben mit Rückflußkühler mit 50 ml 6 n HCl 3 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurde mit 1 n NaOH an der pH-Elektrode neutralisiert. Unlösliche Reaktionsrückstände wurden über ein eingewogenes Faltenfilter abfiltriert. Das Faltenfilter wurde im Trockenschrank bei 100 ^{o}C getrocknet und ausgewogen. Der unlösliche Rückstand betrug 8,3 mg. Die neutralisierte Lösung wurde zur Entsalzung über eine Ultrafiltrationsmembran der Ausschlußgrenze 1000 dalton unter 3 bar Stickstoffdruck filtriert. Der Ultrafiltrationsrückstand wurde am Rotationsverdampfer eingeengt (Badtemperatur nicht über 40 ^{o}C), quantitativ in eine Wäageschale überführt und lyophilisiert. Es wurden 80,7 mg Huminsäure-Hydrolysat erhalten. 11 mg der eingesetzten Huminsäure waren Verlust, teilweise der Anteil, der die Ultrafiltrationsmembran passierte und mit dem NaCl der Neutralisation verworfen wurde.

5. Reaktionen mit Iodwasserstoffsäure (57 %)

Verfahren 1:

1 g Huminsäure wurde in 100 ml Wasser gelöst, dazu wurden 2 - 5 g Iodwasserstoff entsprechend 4 - 10 ml 57 %-ige Iodwasserstoffsäure gegeben. Die Reaktionsmischung wurde in einem 250-ml-Rundkolben mit Rückflußkühler unter Rühren 3 - 24 Stunden gekocht. Nach dem Abkühlen wurde an der pH-Elektrode mit 1 n NaOH neutralisiert. Unlösliche Rückstände wurden abfiltriert.
Das neutralisierte Reaktionsgemisch sollte bei 3 bar Stickstoffdruck über eine Ultrafiltrationsmembran der Ausschlußgrenze 1000 dalton filtriert werden, jedoch scheiterte dies daran, daß einerseits ein großer Anteil des Gemisches die Membran passierte, andererseits daß der Überstand ausflockte. Auf eine weitere Aufarbeitung wurde verzichtet, zumal die Ultrafiltrationsmembran verstopfte und damit nicht wieder verwendbar war.

Verfahren 2:

Eine Huminsäurelösung wurde wie beim Verfahren 1 mit Iodwasserstoffsäure unter Rückfluß 3 - 24 Stunden gekocht, und nach dem Erkalten mit 1 n NaOH neutralisiert. Das gesamte neutralisierte Reaktionsgemisch wurde mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln extrahiert (in mehreren Versuchen kamen zum Einsatz: Petrolether (30-50), Diethylether, Cyclohexan, Toluol, Methylenchlorid, Chloroform und Essigsäurediethylester). Die Extrakte enthielten größere Mengen an freiem Iod. Daher wurde entweder mit Natriumthiosulfat-Lösungen ausgeschüttelt, oder direkt über festes Natriumthiosulfat filtriert, bis Entfärbung eintrat. Die organischen Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert.

Verfahren 3:

Eine Huminsäurelösung wurde wie bei Verfahren 1 mit Iodwasserstoffsäure versetzt und mit organischen Lösungsmitteln überschich-

tet (es wurde Toluol, Methylenchlorid, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff eingesetzt). Dann wurde diese Zweiphasensystem unter Rückfluß gekocht. Es wurden zwei Varianten ausprobiert:

a) Wässrige Phase 100 ml, organische Phase 10 -20 ml

b) Wässrige Phase 20 ml, organische Phase 100 ml

Nach dem Erkalten wurde die organische Phase abgetrennt und über ein Gemisch von Natriumhydrogencarbonat, Natriumthiosulfat und Natriumsulfat filtriert, um zu entsäuern, das freigesetzte Iod zu reduzieren und zu entfernen und zu trocknen.

Die organischen Extrakte wurden anschließend einrotiert.

Verfahren 4:

500 mg Huminsäure wurden in 150 ml Methanol suspendiert (24 Stunden kräftiges Rühren) und 5 ml 57 %-ige Iodwasserstoffsäure zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 8 Stunden unter Rückfluß gekocht. die abgekühlte Reaktionsmischung wurde vom Unlöslichen durch Filtration abgetrennt und anschließend einrotiert. Der Rückstand wurde mit organischen Lösungsmitteln aufgekocht, und diese Extrakte über ein Gemisch von $NaHCO_3$, $Na_2S_2O_3$ und Na_2SO_4 filtriert. Die organischen Extrakte wurden einrotiert.

6. Versuche zur Löslichkeit

6.1. Methanol

Zu einer Lösung von 300 mg Huminsäure in 10 ml Wasser wurden in einem Becherglas unter kräftigem Rühren, anfangs tropfenweise später schubweise 300 ml Methanol zugegeben. Nach Beendigung der Methanolzugabe war eine leichte Trübung durch Ausgeflocktes in der Lösung zu beobachten. Die Trübung wurde abfiltriert, dann wurde mehrfach über Natriumsulfat filtriert, bis direkt zugegebenes Natriumsulfat keine Feuchtigkeitsspuren mehr anzeigte. Diese wasserfreie Huminsäurelösung wurde einrotiert und der Rückstand ausgewogen. Bei mehrfachen Bestimmungen mit verschiedenen Huminsäuren wurden 202 - 285 mg zurückgewogen.

6.2. Dimethylsulfoxid

Zu einer Lösung von 300 mg Huminsäure in 10 ml Wasser wurden in einem Becherglas unter kräftigem Rühren anfangs tropfenweise, später schubweise 200 ml DMSO zugegeben. Nach Beendigung der DMSO-Zugabe waren in der braunen Lösung wenige dunkelbraune Flocken zu beobachten, von denen über ein eingewogenes Faltenfilter abfiltriert wurde. Die Rückwaage der getrockneten Faltenfilter erbrachte zwischen 30 und 60 mg Ausgeflocktes.
Die DMSO-Huminsäurelösung, die noch das Wasser enthielt, wurde am Rotationsverdampfer (Badtemperatur 100 ^{o}C) möglichst weitgehend eingeengt. Dann wurde wieder in 100 ml DMSO aufgenommen und erneut einrotiert. Damit wurde durch mehrmalige azeotrope Destillation das Wasser entfernt. Nach viermaligem Einrotieren und Wiederaufnehmen in DMSO wurde eine klare braune Lösung von Huminsäure in DMSO erhalten.

7. IR-Spektroskopie

Von trockenen Huminsäureproben wurden 2 mg mit 300 mg Kaliumbromid (für spektroskopische Zwecke, Fa. Merck) von Hand in einer Achat-Reibschale verrieben und unter Vakuum zu einer Tablette gepresst.
Als Referenz diente ein reiner KBr-Pressling.

Organisch lösliche Substanzgemische aus den Iodwasserstoffreaktionen wurden entweder direkt mit dem Spatel, oder in trockenem Tetrachlorkohlenstoff gelöst, auf Kochsalzplatten aufgetragen. Dann wurde gewartet, bis das Lösungsmittel im Luftstrom verdunstet war. Die Messung erfolgte direkt (Referenz: Luft).

Spalteinstellung: N
Geschwindigkeit: slow

8. NMR-Spektroskopie

8.1. Messung der Substanzgemische aus den Reaktionen mit Iodwasserstoffsäure

Es wurden ^{1}H-NMR-Spektren an einem Spektrometer WH 80, Bruker, gemessen.

Lösungsmittel:	$CDCl_3$-d_1 und CD_3OD-d_4
Meßfrequenz:	80 MHz
Anzahl der scans:	ca. 1000

8.2. ^{1}H-NMR-Spektren von Huminsäure

10 - 20 mg Huminsäure wurden in 1 - 2 ml D_2O (99,9% deuteriert, Fa. Merck) gelöst. Die Lösungen wurden über eine mit Filterpapier gestopfte Pasteurpipette filtriert. Die Lösungen wurden im Meßröhrchen für drei Minuten mit Stickstoff begast und dann mit einem Teflon-Plug verschlossen.

a) Messungen am Spektrometer WP 90, Bruker:

Meßfrequenz:	90 MHz
Meßtemperatur:	27 ^{o}C
Pulswinkel:	3,0 µsec
Spektrenbreite:	3000 Hz
Anzahl der scans:	5000 - 10000

Es wurde nach dem "gated-decoupling-Verfahren" zur Unterdrückung der HDO-Resonanz des Lösungsmittels gemessen.

b) Messungen am Spektrometer WM 400, Bruker:

Meßfrequenz:	400,13 MHz
Pulswinkel:	1,0 - 4,0 µsec
Anzahl der scans:	150 - 600

Es wurde nach dem "gated-decoupling-Verfahren gemessen.

8.3. ^{13}C-CP/MAS-NMR-Spektren [8]

300 mg Huminsäure wurden in 6,3 mm-Rotoren aus Plexiglas gegeben. Die Messung erfolgte auf einem Spektrometer CXP 300 FT, Fa. Bruker.

Meßfrequenz:	50,63 MHz
90 ^{o} Pulslänge:	5 µsec
Kontaktzeit:	3 msec
Repetitionszeit:	4 - 6 sec
Rotationsfrequenz:	3,5 - 5 kHz
Magic angle:	54,7 ^{o}

8) Ich danke der Fa. Bruker, Karlsruhe, für die Möglichkeit der Messungen

IV. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals reine, native Huminsäuren in größeren Mengen im Labor dargestellt. Dazu wurde ein spezieller Laborreaktor konstruiert, in dem verschiedene Klär- und Bakterienschlämme aerob-thermophil abgebaut wurden.
Um einerseits abwasserspezifische Verunreinigungen der Huminsäuren auszuschalten, und andererseits Erkenntnisse über die mikrobiologische Entstehung von Huminsäuren zu gewinnen, wurden in einer Versuchsanlage Bakterienschlämme gezüchtet, die bei einer Ernährung mit Zucker bzw. Milch, sowohl eine einseitige Population an Mikroorganismen aufwiesen, als auch frei von abwasserbedingten Verunreinigungen waren.
Durch eine präzise Energiebilanzierung, die durch fortlaufende Temperaturmessung in dem geeichten Reaktorgefäß möglich wurde, konnten deutliche Zusammenhänge zwischen Reaktionswärmen und Huminsäureausbeuten erhalten werden. So steigt die Huminsäureausbeute linear mit der Zunahme der spezifischen Reaktionswärme (der Wärmemenge pro Gramm abgebauter organischer Trockensubstanz) und exponentiell mit der Zunahme der Gesamtreaktionswärme. Dabei ist die Huminsäurebildung nicht von der Menge an abgebauter organischer Trockensubstanz abhängig, wiewohl dieser Abbau immer stattfindet, jedoch nicht mit einer wesentlichen Wärmetönung verbunden sein muß. Diese Gesetzmäßigkeiten galten für alle Abbauversuche, unabhängig von der Zusammensetzung der Biomasse, mit einer für biologische Versuche sehr hohen Korrelation. Die Ergebnisse der aerob-thermophilen Abbauversuche legten die Vermutung nahe, daß die Bildung der Huminsäuren mit dem Vorhandensein von thermophilen Mikroorganismen verknüpft sein muß, die dann entweder direkt oder indirekt an der Entstehung dieser Substanz beteiligt sein müssen.

Zur Isolierung der Huminsäuren aus den aerob-thermophil abgebauten Klär- und Bakterienschlämmen wurden schonendste Methoden, wie z.B. die Ultrafiltration eingesetzt.

Die isolierten Huminsäuren wurden durch ihre Elementaranalyse, IR-spektroskopische und kernresonanzspektroskopische Untersuchungen charakterisiert. Es wurden die Eigenschaften der Huminsäuren bei der Extraktion mit organischen Lösungsmitteln, dem Verhalten bei der sauren Hydrolyse und dem Verhalten bei der Gelchromatographie untersucht. Es gelang die an sich ausschließlich wasserlösliche Huminsäure weitgehend in Methanol und in Dimethylsulfoxid zu lösen.

Zur Strukturaufklärung wurde versucht, die auf Grund vorangegangener Untersuchungen vermutete Dominanz von Etherbindungen im Huminsäuremolekül durch Etherspaltung mit Iodwasserstoffsäure nachzuweisen. Im Vordergrund der Strukturuntersuchungen standen aber die kernresonanzspektroskopischen Messungen mit hochauflösenden Spektrometern.
Wenn auch mit Iodwasserstoffsäure keine Etherspaltung gelang, weil periphere Carboxylgruppen reduziert und decarboxiliert wurden, und damit sowohl die etherspaltende Potenz der Iodwasserstoffsäure, als auch die Wasserlöslichkeit der Huminsäuren verloren ging, so wurden jedoch Ketalgruppen gespalten und einzelne Carboxylgruppen verestert. Solche Gruppierungen konnten spektroskopisch charakterisiert werden. Außerdem konnten in den Reaktionsprodukten massenspektroskopisch die obligatorischen Verunreinigungen der Huminsäuren aus abgebauten Klärschlämmen wie Phtalsäuredialkylester, Silicone und Polyethylenglycole nachgewiesen werden.
Nach den Resultaten der ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-Festkörper-spektroskopischen Untersuchungen konnten neben den Etherbindungen auch Ketal- und Acetalgruppierungen, Carboxylgruppen, terminale kurzkettige Alkylgruppen, sowie vielfach verzweigte und kurzkettige aliphatische Gruppierungen belegt werden. Aromatische Strukturanteile konnten nicht nachgewiesen werden.
Durch Auswertung von Integrationsdaten der ^{13}C-NMR-Spektren konnte erstmals das Kohlenstoff/Sauerstoff-Verhältnis der nativen Huminsäuren bestimmt werden, das trotz aller Einschränkungen, die man bei dieser Auswertungsmethode machen muß, eine gute Übereinstim-

mung mit der Elementaranalyse zeigte.

Ein konkreter Strukturvorschlag wurde nicht gemacht, da die Beweiskraft der Untersuchungen dafür noch nicht ausreichend erschien, jedoch kann man die Aussage machen, daß das native Huminsäuremolekül aus einem dreidimensional eng vernetzten Strukturgerüst besteht, in dem einfach gebundener Sauerstoff in Ether-, Ketal- und Acetalbindungen das entscheidende Bindungsprinzip darstellt. So sind etwa die Hälfte aller Kohlenstoffatome im Huminsäuremolekül an den Etherbrücken beteiligt. Peripher gelegene Carboxylgruppen, über kurze aliphatische Gruppen an das Molekül gebunden, vermitteln die gute Wasserlöslichkeit der Huminsäuren.

Damit ist es erstmals gelungen, ein Bild des nativen Huminsäuremoleküls zu zeichnen, in dem alle wesentlichen Strukturelemente aufgezeigt werden konnten, und das zwanglos alle bisher beobachteten Eigenschaften, wie das Komplexierungsverhalten, das Verhalten bei bestimmten Reaktionen und die Ergebnisse von analytischen Untersuchungen in ein in sich schlüssiges System brachte.

V. LITERATURVERZEICHNIS

1 M. Schnitzer, S. U. Khan; Humic Substances in the Environment, M. Dekker, New York, (1972)

2 F. Hoppe-Seyler; Z. physiol. Chem. 13, 66, (1889)

3 J. C. G. Ottow; Naturwiss. 65, 413, (1978)

4 R. A. Bourbonnière, P. A. Meyers; Can. J. Spectr. 23, 35, (1978)

5 F. H. Frimmel; Z. Wasser Abwasser Forsch. 14, 7, (1981)

6 J. P. Frizado; ACS Symp. Ser. 1979, 93 (Chem. Model. Aqueous Syst.: Speciation, Sorption, Solubility, Kinet.), 133 - 145, (1979)

7 P. G. Hatcher, R. Rowan, M. A. Mattingly; Org. Geochem. 2, 77, (1980)

8 B. R. T. Simoneit; Adv. Org. Geochem., 343, (1980)

9 D. H. Stuermer, G. R. Harvey; Mar. Chem. 6, 55, (1978)

10 P. Ioselis, R. Ikan, M. Frenkel; Adv. Org. Geochem. 1979, (eds. Douglas and Maxwell, J. R.), Pergamon Press Oxford, (1980)

11 F. Martin, C. Saiz-Jimenez; Fuel 57, 353, (1978)

12 A. Nissenbaum; Geochim. Cosmochim. Acta 44, 1973, (1979)

13 K. E. Peters, B. G. Rohrback, I. R. Kaplan; AAPG Bull. 65, 688, (1981)

14 M. Cetinkaya, J. Düszeln, v., B. Gabel, M. Gürlük, U. Lahl, A. Podbielski, B. Stachel, W. Thiemann; Z. Wasser Abwasser Forsch. 13, 213, (1980)

15 F. H. Frimmel; Vom Wasser 49, 1, (1977)

16 F. H. Frimmel, A. Immerz, H. Niedermann, D. Sattler; Z. Wasser Abwasser Forsch. 13, 217, (1980)

17 F. H. Frimmel, H. Niedermann; Z. Wasser Abwasser Forsch. 13, 119, (1980)

18 H. Haan, de, T. Boer, de; Arch. Hydrobiol. 85, 30, (1979)

19 E.M.Perdue; ACS Symp. Ser. 1979, 93, (Chem. Model. Aqueous Syst.: Speciation, Sorption, Solubility, Kinet.), 99 - 114, (1979)

20 E.R.Sholkowitz, D.Copland; Geochim. Cosmochim. Acta 45, 181, (1981)

21 R.A.Skogerboe, S.A.Wilson; Anal. Chem. 53, 228, (1981)

22 S.A.Wilson, J.H.Weber; Prepr. Pap. Natl. Meet., Div. Environ. Chem., Am. Chem. Soc. 15, 229 - 231, (1975)

23 S.A.Wilson, J.H.Weber; Chem.Geol. 19, 285, (1977)

24 J.Witthauer, R.Kloecking; Acta hydrochim. hydrobiol. 9, 281, (1981)

25 S.A.Boyd, L.E.Sommers, D.W.Nelson; Soil Sci. Soc. Am. J. 44, 179, (1980)

26 K.M.Holtzclaw, G.Sposito; Soil Sci. Soc. Am. J. 42, 607, (1978)

27 G.P.Manos, E.Tsai; Water Air Soil Pollut. 13, 373, (1980)

28 L.W.Newland, J.R.T.Eyck, V.K.Ohr; Identif. Anal. Org. Pollut. Water, (Chem. Congr. North Am. Cont.) 1st 1975, 281 - 296, ed. by L.H.Keith, Ann Arbor Sci., (1976)

29 G.Sposito, K.M.Holtzclaw, J.Baham; Soil Sci. Soc. Am. J. 40, 691, (1976)

30 G.Sposito, K.M.Holtzclaw, D.A.Keech
Soil Sci. Soc. Am.J. 41, 1119, (1977)

31 G.Sposito, G.D.Schaumberg, T.G.Perkins, K.M.Holtzclaw; Environ. Sci. Technol. 12, 931, (1978)

32 G.R.Aiken, E.M.Thurman, R.L.Malcolm, H.F.Walton; Anal. Chem. 51, 1799, (1979)

33 W.Bergmann, Dissertation, Universität Tübingen, (1978)

34 J.Chudoba, P.Lischke, F.Tuček; Acta hydrochim. hydrobiol. 4, 397, (1973)

35 K.Jahns, Dissertation, Universität Tübingen, (1980)

36 D.R.Sachdev, J.J.Ferris, N.L.Clesceri; J. Water Poll. Control Fed. 48, 570, (1976)

37 A.H.Khairy; Ernährungsheilkunde 11, 898, (1981)

38 K. Haider, J. P. Martin; Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 31, 766, (1967)

39 K. Haider, J. P. Martin; Soil Biol. Biochem. 2, 145, (1970)

40 K. Haider, B. R. Nagar, C. Saiz, H. L. C. Meuzelaar, J. P. Martin; Soil Org. Matter Stud., Proc. Symp. 1976 (pub. 1977) 2, 213 - 220, IAEA: Vienna, Austria

41 H. J. Kutzner; Landwirtsch. Forsch. 21, 48, (1968)

42 J. P. Martin, K. Haider, D. Wolf; Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 36, 311, (1972)

43 R. Kickuth; Chem. Labor Betrieb 23, 431, (1972)

44 F. Scheffer, B. Ulrich; Humus und Humusdüngung, F. Enke Verlag, Stuttgart, (1960)

45 M. Schnitzer, M. I. O. Serra, de; Can. J. Chem. 51, 1554, (1972)

46 A. K. Banik, A. Chakraborty, B. Paira; Proc. Indian Nat. Sci. Acad. 46, 414, (1980)

47 J. P. Martin, K. Haider; Soil Sci. 107, 260, (1969)

48 V. K. Mutatker, G. H. Wagner; Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 31, 66, (1967)

49 E. Fustec-Mathon, K. Haider, J. P. Martin, M. R. Heim; C. R. Acad. Sci. Paris, 276, Serie D, 929, (1973)

50 D. R. Narine, R. D. Guy; Soil Sci. 133, 356, (1982)

51 N. Senesi; Z. Pflanzenernaehr. Bodenk. 144, 580, (1981)

52 N. Senesi, C. Testini; Soil Sci. 130, 314, (1980)

53 B. G. Oliver; Can. Res., 21, (1978)

54 B. D. Quimby, M. F. Delaney, P. C. Uden, R. M. Barnes; Anal. Chem. 52, 259, (1980)

55 R. Sander, W. Kühn, H. Sontheimer; Z. Wasser Abwasser Forsch. 10, 155, (1977)

56 E. Gilbert; Vom Wasser 55, 1, (1980)

57 J. Lawrence, H. Tosine, F. I. Onuska, M. E. Comba; Ozone: Science and Engineering 2, 55, (1980)

58 J. B. Green, S. E. Manahan; Fuel 60, 330, (1981)

59 E.M. Thurman, R.L. Wershaw, R.L. Malcolm, D.J. Pinckney; Org. Geochem. 4, 27, (1982)

60 W. Ziechmann; Z. Pflanzenernaehr. Bodenk. 140, 151, (1977)

61 D.S. Orlov; Biologioeskie nauki 20, 5, (1977)

62 W. Eisener; Diplomarbeit, Universität Tübingen, (1979)

63 K. Jahns; Diplomarbeit, Universität Tübingen, (1978)

64 R.H. Pierce, G.T. Felbeck; Proc., Int. Meet. Humic Substances, Nieuwersluis, Pudoc, Wageningen, 217 - 232, (1972)

65 H.A. Anderson, A.R. Fraser, A. Hepburn, J.D. Russell; J. Soil Sci. 28, 623, (1977)

66 U. Müller-Wegener; Chem. Erde 36, 352, (1977)

67 B. Ceccanti, M.T. Bertolucci, P. Nannipieri; Rec. Develop. Chromat. Electrophor. 10, 75, (1980)

68 D.H. Stuermer, G.R. Harvey; Deap Sea Res. 24, 301, (1977)

69 A.H. Khairy, W. Ziechmann; Z. Pflanzenernaehr. Bodenk. 144, 407, (1981)

70 D.S. Alderdice, R.C. Brian, W. Creswick, W.D. Johnson; Aust. J. Soil Res. 16, 41, (1978)

71 D.J. Linehan; J. Soil Sci. 28, 369, (1977)

72 B.L. Worobey, G.R.B. Webster; Nature 292, 526, (1981)

73 Y. Chen, N. Senesi, M. Schnitzer; Geoderma 20, 87, (1978)

74 T. Higashi, K. Wada; J. Soil Sci. 28, 653, (1977)

75 J.A. Neyroud, M. Schnitzer; Soil Org. Matter Stud., Proc. Symp. 1976, (pub. 1977) 2, 157 - 169, IAEA: Vienna, Austria

76 R.K. Shah, M.R. Chokshi, B.C. Joshi, V.C. Lala; Chem. Era, 277, (1977)

77 F.J. González-Vila, F. Martin, C. Sáiz-Jiménez, H.H. Nimz; J. Therm. Anal. 15, 279, (1979)

78 V.G. Aranda, J. Osácar, G. Revuelta; Quim. Anal. 31, 9, (1977)

79 H.L.C. Meuzelaar, K. Haider, B.R. Nagar, J.P. Martin; Geoderma 17, 239, (1977)

80 G. Mindermann; Neth. J. Agric. Sci. 27, 277, (1977)

81 C. Saiz-Jimenez, K. Haider, H. L. C. Meuzelaar; Geoderma 22, 25, (1979)

82 C. Saiz-Jimenez, F. Martin, K. Haider, H. L. C. Meuzelaar; Agrochim. 22, 353, (1978)

83 J. M. Bracewell, G. W. Robertson, D. I. Welch; J. Anal. Appl. Pyrolysis 2, 239, (1980)

84 F. Martin, C. Saiz-Jimenez, A. Cert; Soil Sci. Soc. Am. J. 41, 1114, (1977)

85 F. Martin, C. Saiz-Jimenez, A. Cert; Soil Sci. Soc. Am. J. 43, 309, (1979)

86 R. W. Aldag; Soil Org. Matter Stud., Proc. Symp. 1976, (pub. 1977) 1, 293 - 299, IAEA: Vienna, Austria

87 H. A. Anderson, A. Hepburn, A. Sim; J. Soil Sci. 29, 84, (1978)

88 R. D. Haworth; Soil Sci. 111, 71, (1971)

89 T. Jakob, P. Dubach, N. C. Mehta, H. Deuel; Z. Pflanzenernaehr. Düng. Bodenk. 16, 213, (1962)

90 R. Riffaldi, M. Schnitzer; Soil Sci. 115, 349, (1973)

91 J. B. Green, S. E. Manahan; Anal. Chem. 51, 1126, (1979)

92 Y. Matsui, K. Kumada; Soil Sci. Plant Nutr. 23, 491, (1977)

93 S. M. Griffith, F. J. Sowden, M. Schnitzer; Soil Biol. Biochem. 8, 529, (1976)

94 R. Scialdone, A. Ramunni; Agrochim. 22, 344, (1978)

95 O. B. Maximov, T. V. Shvets, Y. N. Elkin; Geoderma 19, 63, (1977)

96 G. Ogner, T. Grønneberg; Geoderma 19, 237, (1977)

97 M. Schnitzer, S. L. M. Skinner; Can. J. Chem. 52, 1072, (1974)

98 M. Spiteller; Z. Pflanzenernaehr. Bodenk. 144, 472, (1981)

99 O. B. Maximov, N. P. Krasovskaya; Geoderma 18, 227, (1977)

100 D. F. Marino, J. D. Ingle, jr.; Anal. Chim. Acta 124, 23, (1981)

101 J. Slawinski, W. Puzyna, D. Slawinska; Photochem. Photobiol. 28, 75, (1978)

102 K. Lundquist, B. Josefsson, G. Nyquist; Holzforsch. 32, 27, (1978)

103 A. J. Stewart, R. G. Wetzel; Limnol. Oceaogr. 25, 559, (1980)

104 Tsutsuki, K., S. Kuwatsuka; Soil Sci. Pant Nutr. 25, 501, (1979)

105 K. Ghosh, M. Schnitzer; Soil Sci. Soc. Am. J. 44, 975, (1980)

106 C. Varadachari, K. Ghosh, M. Schnitzer, T.-W. Yang; Soil Sci. Soc. Am. J. 45, 830, (1981)

107 P. MacCarthy, M. J. Peterson, R. L. Malcolm, E. M. Thurman; Anal. Chem. 51, 2041, (1979)

108 M. A. Curtis, A. F. Witt, S. B. Schram, L. B. Rogers; Anal. Chem. 53, 1195, (1980)

109 M. N. Gonzalez, de, M. Castagnola, D. Rosetti; J. Chrom. 209, 421, (1981)

110 K. Kumada, O. Sato; Soil Sci. Plant. Nutr. 26, 309, (1980)

111 J. D. Russell, H. A. Anderson; Plant Soil 48, 547, (1977)

112 P. Sklodowski, H. Kaminska; Pol. J. Soil Sci. 10, 107, (1977)

113 K. H. Tan; Plant Soil 48, 89, (1977)

114 V. N. Vasantharajan; J. Ind. Inst. Sci 59, 75, (1977)

115 O. H. Danneberg; Soil Org. Matter Stud., Proc. Symp. 1976, (pub. 1977) 2, 221 - 228, IAEA: Vienna, Austria

116 O. H. Danneberg, J. Schmidt; Bodenkultur 29, 1, (1978)

117 R. L. Burwell; Chem. Rev. 54, 615, (1954)

118 S. U. Khan, M. Schnitzer; Can. J. Chem. 49, 2302, (1971)

119 P. F. Barron, M. A. Wilson; Nature 289, 275, (1981)

120 F. J. Gonzalez-Vila, F. Martin, C. Saiz-Jimenez, H. Lentz, H. D. Lüdemann; Agrochim. 22, 501, (1978)

121 G. Grant; Nature 270, 709, (1977)

122 P. G. Hatcher, G. E. Maciel, L. W. Dennis; Org. Geochem. 3, 43, (1981)

123 P. G. Hatcher, D. L. VanderHart, W. L. Earl; Org. Geochem. 2, 87, (1980)

124 B. Lakatos, J. Meisel; Acta Agronom. Acad. Sci. Hung. 27, 313, (1978)

125 H. Lentz, H. D. Lüdemann, W. Ziechmann; Geoderma 18, 325, (1977)

126 M.A.Mikita, C.Steelink, R.L.Wershaw; Anal. Chem. 53, 1715, (1981)

127 R.H.Newman, K.R.Tate, P.F.Barron, M.A.Wilson; J. Soil Sci. 31, 623, (1980)

128 J.A.Neyroud, J.M.Schnitzer; Can. J. Chem. 52, 4123, (1974)

129 G.Ogner, Soil Biol. Biochem. 11, 105, (1979)

130 C.M.Preston, J.A.Ripmeester; Can. J. Spectros. 27, 99, (1982)

131 P.Ruggiero, F.S.Interesse, O.Sciacovelli; Soil Biol. Biochem. 12, 297, (1980)

132 P.Ruggiero, F.S.Interesse, L.Cassidei, O.Sciacovelli; Geochim. Cosmochim. Acta 44, 604, (1980)

133 P.Ruggiero, F.S.Interesse, O.Sciacovelli; Geochim. Cosmochim. Acta 43, 1771, (1979)

134 P.Ruggiero, O.Sciacovelli, C.Testini, F.S.Interesse; Geochim. Cosmochim. Acta 42, 411, (1978)

135 Y.Saito, S.Hayano; J. Oceanograph. Soc. Jpn. 36, 286, (1981)

136 D.H.Stuermer, J.R.Payne; Geochim. Cosmochim. Acta 40, 1109, (1976)

137 M.A.Wilson, P.F.Barron, A.H.Gillam; Geochim. Cosmochim. Acta 45, 1743, (1981)

138 M.A.Wilson, K.M.Goh; J. Soil Sci. 28, 645, (1977)

139 M.A.Wilson, K.M.Goh; Plant Soil 46, 287, (1977)

140 M.A.Wilson, K.M.Goh; Geochim. Cosmochim. Acta 45, 489, (1981)

141 M.A.Wilson, A.J.Jones, B.Williamson; Nature 276, 487, (1978)

142 A.L.Abdul-Halim, J.C.Evans, C.C.Rowlands, J.H.Thomas; Geochim. Cosmochim. Acta 45, 481, (1980)

143 H.A.Anderson, A.Hepburn; J.Soil Sci. 28, 634, (1977)

144 H.A.Anderson, J.D.Russell; Nature 260, 597, (1976)

145 F.Andreux, D.Golebiowska, T.Chone, F.Jacquin, M.Metche; Soil Org. Matter Stud., Proc. Symp. 1976, (pub. 1977) 2, 43 - 57, IAEA: Vienna, Austria

146 E. M. Balabanova-Radonova, M. D. Stefanova, R. N. Nikolov; Fuel 59, 271, (1980)

147 A. K. Banik, A. Chakraborty, B. Paira; Proc. Ind. Nat. Sci. Acad. 46, 414, (1980)

148 A. Beveridge, W. F. Pickering; Water Air Soil Pollut. 14, 171, (1980)

149 S. A. Boyd, L. E. Sommers, D. W. Nelson; Soil Sci. Soc. Am. J. 44, 179, (1980)

150 B. Brady, G. K. Pagenkopf; Can. J. Chem. 56, 2331, (1978)

151 R. D. Burch, C. H. Langford, D. S. Gamble; Can. J. Chem. 56, 1196, (1978)

152 P. MacCarthy, Malcolm, R. L.; Trace Organic Analysis: A New Frontier in Analytical Chemistry, S. N. Chesler and H. S. Hertz, Eds., Nat. Bur. Stand. (U.S.), Spec. Publ. 519, 793, (1979)

153 P. MacCarthy, M. J. Peterson, R. L. Malcolm, E. M. Thurman; Anal. Chem. 51, 2041, (1979)

154 P. Chassin, R. Calvet, M. Tercé; C. R. Acad. Sc. Paris, Serie C, 291, 165, (1980)

155 Y. Chen, N. Senesi, M. Schnitzer; Soil Sci. Soc. Am. J. 41, 352, (1977)

156 V. A. Chernikov, E. Z. Tepper; Izv. Timir. selskch. Akad. Moskva 1, 87, (1982)

157 K. L. Clay, R. C. Murphy; J. Chrom. 164, 417, (1979)

158 A. Cominoli, J. Buffle, W. Haerdi; J. Electroanal. Chem. 110, 259, (1980)

159 K. Debosz; Roczniki Akademii Rolniczej w Poznanin 109, 13, (1979)

160 K. Deczky, C. H. Langford; Can. J. Chem. 56, 1947, (1978)

161 E. Dorado, A. Polo; Anal. edafol. agrobiol. 35, 723, (1976)

162 C. H. Fuchsmann; Telma 11, 177, (1981)

163 D. S. Gamble; Can. J. Chem. 50, 2680, (1972)

164 D. S. Gamble; Can. J. Chem. 51, 3217, (1973)

165 D. S. Gamble, C. H. Langford, J. P. K. Tong; Can. J. Chem. 54, 1239, (1976)

166 K. Ghosh, M. Schnitzer; Soil Sci. 129, 266, (1980)

167 R. C. Ghosh, R. M. Singhal, S. D. Sharma; Ind. Forester 106, 205, (1980)

168 S. M. Griffith, M. Schnitzer; Soil Sci. Soc. Am. J. 39, 861, (1975)

169 R. D. Guy, C. L. Chakrabarti; Can. J. Chem. 54, 2600, (1976)

170 D. Hatton, W. F. Pickering; Water Air Soil Pollut. 14, 13, (1980)

171 J. K. Hong, I. Yamane; Soil Sci. Plant Nutr. 26, 391, (1980)

172 D. Hongve, O. K. Skogheim, A. Hindar, H. Abrahamsen; Bull. Environm. Contam. Toxicol. 25, 594, (1980)

173 H. Kerndorff, M. Schnitzer; Geochim. Cosmochim. Acta 44, 1701, (1980)

174 R. Kickuth; Chem. Labor Betrieb 23, 540, (1972)

175 R. Kickuth, F. Scheffer; Agrochim. 20, 373, (1976)

176 B. Kribek, J. Podlaha; Organ. Geochem. 2, 93, (1980)

177 F. Kunc, R. A. Lokhmacheva, J. Macura; Folia Microbiol. 21, (1976)

178 J. C. T. Kwak, R. W. P. Nelson, D. S. Gamble; Geochim. Cosmochim. Acta 41, 993, (1977)

179 J. P. Martin, K. Haider; Soil Sci. 107, 260, (1969)

180 J. P. Martin, K. Haider; Soil Sci. Soc. Am. J. 44, 983, (1980)

181 F. Martin, C. Saiz-Jimenez, F. J. Gonzalez-Vila; Soil Sci. 132, 200, (1981)

182 Y. Matsui, K. Kumada; Soil Sci. Plant Nutr. 23, 341, (1977)

183 G. Mindermann; Neth. J. agric. Sci. 27, 277, (1977)

184 U. Müller-Wegener; Naturwiss. 64, 385, (1977)

185 U. Müller-Wegener, W. Ziechmann; Z. Pflanzenernaehr. Bodenk. 143, 247, (1980)

186 G. Ogner; Soil Sci. 116, 93, (1973)

187 G. Ogner; Geoderma 23, 1, (1980)

188 W. Pflug, W. Ziechmann; Soil Biol. Biochem. 14, 165, (1982)

189 A. Ramunni, R. Scialdone; Ann. Fac. Sci. agrar. Univ. Stud. Napoli, 9 - 10, 292, (1976)

190 W. Rochus; Mitteilgn. Dtsch. Bodenkundl. Gesellsch. 30, 37, (1981)

191 W. Rochus, S. Sipos; Agrochim. 22, 446, (1976)

192 P. Ruggiero, F. S. Interesse, O. Sciacovelli; Soil Biol. Biochem. 12, 297, (1980)

193 O. Sato; Soil Sci. Plant Nutr. 22, 485, (1976)

194 M. Scoullos, D. Katakis; Chim. Chron., New Ser. 8, 181, (1979)

195 N. Senesi; Geochim. Cosmochim. Acta 45, 269, (1981)

196 R. K. Shah, M. R. Chokshi; Chem. Era, 255, (1976)

197 K. Sivapalan; Soil Biol. Biochem. 13, 331, (1981)

198 J. Slawinski, W. Puyna, D. Slawinska; Photochem. Photobiol. 28, 459, (1978)

199 W. Schimmack, K. Bunzl; Chemosphere 10, 777, (1979)

200 M. Schnitzer; Agrochim. 22, 216, (1978)

201 M. Schnitzer, D. A. Hindle; Can. J. Soil Sci. 60, 541, (1980)

202 K. R. Schulz, H. Lentz, W. Ziechmann; Erdöl Kohle Erdgas Petrochem. 33, 42, (1980)

203 I. L. Stevenson, M. Schnitzer; Soil Sci. 133, 179, (1982)

204 K. H. Tan; Soil Sci. 123, 235, (1977)

205 K. H. Tan; Plant Soil 47, 263, (1977)

206 K. H. Tan, V. Nopamornbodi; Soil Biol. Biochem. 11, 651, (1979)

207 K. R. Tate, H. A. Anderson; J. Soil Sci. 29, 76, (1978)

208 E. Tipping; Geochim. Cosmochim. Acta 45, 191, (1981)

209 R. T. Truitt, J. H. Weber; Anal. Chem. 53, 337, (1981)

210 R. L. Wershaw, D. J. Pinckney; J. Res. U. S. Geol. Surv. 5, 571, (1977)

211 R. L. Wershaw, D. J. Pinckney; Science 199, 906, (1978)

212 R. L. Wershaw, D. J. Pinckney, S. E. Booker; J. Res. U. S. Geol. Surv. 5, 565, (1977)

213 P. Westbroek, P. H. Meide, van der, J. S. Kloppers, van der, R. J. Sluis, van der, J. W. Leeuw, de, E. W. Jong, de; Paleobiol. 5, 151, (1979)

214 J. Witthauer; Acta hydrochim. hydrobiol. 4, 509, (1976)

215 J. Witthauer; Fresenius Z. Anal. Chem. 299, 264 (1979)

216 W. Ziechmann; Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd. 140, 151, (1977)

217 V. J. Bartuska, G. E. Maciel, J. Schaefer, E. O. Stejskal; Fuel 56, 354 (1977)

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Babel, E. Bayer, W. Braun, E. Breitmaier, J. Gelinek, R. Hamm, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Häfelinger, S. Kemmler-Sack, U. Kessler, W. Kiedaisch, O. Klee, G. Kortüm, L. Koschmieder, H. Krüger, D. Krug, E. Lindner, I.-P. Lorenz, E. Müller, H. Mauser, H. Oberhammer, D. Oelkrug, G. Opitz, H. Pauschmann, G. Pausewang, W. Rüdorff, M. Rau, W. Rundel, W. Schweizer, F. Seelig, J. Strähle, E. Stumpp, H. Suhr, H.-G. Trieschmann, W. Zeil

Lebenslauf

19. 8. 1949	Geburt in Ebingen (jetzt Albstadt), Krs. Balingen als Sohn des Ingenieurs Heinrich Eisener und seiner Ehefrau Marie-Luise, geb. Voigt
1956 - 1960	Mörike-Grundschule in Tübingen
1960 - 1968	Kepler-Gymnasium in Tübingen
Juni 1968	Reifeprüfung
1968 - 1978	Studium der Chemie an der Universität Tübingen
Mai 1973	Vordiplomprüfung in Chemie
Mai 1978	Mündliche Diplomprüfung in Chemie
August 1978 - Mai 1979	Diplomarbeit unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Bayer: "Untersuchungen zur Strukturaufklärung und über die Eigenschaften von Huminsäuren aus Abwasser"
Mai 1979	Diplom
Juni 1979 - Dezember 1982	Experimenteller Teil der Dissertation im Chemischen Institut der Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Bayer: "Untersuchungen zur Genese und Strukturaufklärung von Huminsäuren"
seit September 1981	Assistententätigkeit im chemischen Praktikum für Diplombiologen